

# **Das Tumorsuppressor-Homologe p63 als Modulator des Wnt-Signalweges**

## **Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Constanze Möritz**

aus Leipzig

Marburg/Lahn, Juli 2006

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 20. September 2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Matthias Dobbelsstein

Tag der mündlichen Prüfung am 20. Oktober 2006.

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Renate Renkowitz-Pohl

Prof. Dr. Erhard Bremer



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>2</b>
2.1 Der Tumorsuppressor p53 .....	2
2.2 p63 und p73 als Homologe von p53 .....	3
2.3 Die Rolle von p63 im Organismus .....	8
2.3.1 p63-defiziente Tiermodelle und humane p63-Syndrome .....	8
2.3.2 p63 – Tumorsuppressor oder Onkogen ? .....	10
2.4 Wnt-Signaltransduktion.....	11
2.4.1 Wnt-Signalmoleküle regulieren mehrere Signalwege .....	11
2.4.2 Der kanonische Wnt-Signalweg .....	13
2.4.2.1 $\beta$ -Catenin.....	15
2.4.2.2 Tcf/Lef-Faktoren.....	16
2.5 Die Rolle der Wnt-Signaltransduktion bei der Entstehung von Krankheiten .....	16
2.6 Fragestellung .....	19
<b>3 Material.....</b>	<b>20</b>
3.1 Geräte .....	20
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	21
3.3 Chemikalien .....	22
3.4 Kits und Reagenzien.....	24
3.5 Antikörper.....	24
3.5.1 Primärantikörper.....	24
3.5.2 Sekundärantikörper .....	25
3.6 Vektoren und Plasmide.....	25
3.6.1 Vektoren und Expressionsplasmide .....	25
3.6.2 Reporterplasmide .....	26
3.7 Oligonukleotide .....	26

3.8	Bakterienzellen .....	26
3.9	Eukaryotische Zelllinien .....	27
3.10	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur .....	27
3.11	Medien und Lösungen für die Kultur eukaryotischer Zellen .....	27
3.12	Puffer und Lösungen .....	28
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>31</b>
4.1	Zellbiologische Methoden .....	31
4.1.1	Arbeiten mit Bakterien .....	31
4.1.1.1	Transformation durch Elektroporation .....	31
4.1.1.2	Bakterienkultur .....	31
4.1.1.3	Glycerolkultur .....	31
4.1.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	31
4.1.2.1	Kultivierung von HEK-293- und NCI-H1299-Zellen .....	31
4.1.2.2	Einfrieren von Zellen .....	32
4.1.2.3	Liposomen-vermittelte Transfektion mittels Lipofectamine™2000 .....	33
4.2	Molekularbiologische Methoden .....	34
4.2.1	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab .....	34
4.2.2	Plasmidpräparation im mittleren und großen Maßstab .....	34
4.2.3	Reinigung von Nukleinsäuren .....	34
4.2.3.1	QIAquick™ PCR Purification Kit .....	34
4.2.3.2	Ethanol-fällung .....	34
4.2.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	35
4.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	35
4.2.5.1	Agarosegelelektrophorese .....	35
4.2.6	Sequenzanalyse .....	36
4.2.7	Modifizierung von Nukleinsäuren .....	36
4.2.7.1	Analytischer Restriktionsendonukleaseverdau .....	36
4.2.7.2	Ortsgerichtete Mutagenese .....	37
4.2.7.2.1	Herstellung pcDNA3-ΔNp63β .....	39
4.3	Biochemische und Immunologische Methoden .....	39
4.3.1	Dualer Luziferase-Reporterassay .....	39
4.3.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und deren Visualisierung .....	42
4.3.2.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	42
4.3.2.2	Western Blot .....	43
4.3.2.2.1	Entfernen von Antikörpern von NC-Membranen („Strippen“) .....	44

4.3.3	Immunpräzipitation .....	44
4.3.4	Indirekte Immunfluoreszenz .....	45
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
5.1	Das p53-Homolog $\Delta$ Np63 $\alpha$ aktiviert spezifisch die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription und greift in den kanonischen Wnt-Signalweg ein. ....	47
5.1.1	$\Delta$ Np63 $\alpha$ aktiviert einen $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotor. ....	47
5.1.2	$\Delta$ Np63 $\alpha$ ist nicht in der Lage, die Gli-1-regulierte Transkription des Sonic-Hedgehog-Signalweges zu aktivieren .....	50
5.1.3	Die $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Homologen $\Delta$ Np73 $\alpha$ und p53 aktivieren die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription nicht in demselben Maße wie $\Delta$ Np63 $\alpha$ .....	52
5.1.4	Nur tetramere $\Delta$ Np63-Isoformen sind in der Lage, die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription zu aktivieren .....	54
5.1.4.1	$\Delta$ Np63 $\alpha$ und $\Delta$ Np63 $\beta$ sind starke Aktivatoren der $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkription .....	54
5.1.4.2	Die Oligomerisierung von $\Delta$ Np63 $\alpha$ ist essentiell für die Aktivierung $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierter Transkription .....	57
5.1.5	Physiologisch relevante Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne und in der SAM-Domäne von $\Delta$ Np63 $\alpha$ beeinträchtigen die Aktivierung $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierter Transkription .....	59
5.2	$\Delta$ Np63 $\alpha$ reguliert nicht die Phosphorylierung des Transkriptionskofaktors $\beta$ -Catenin .....	61
5.2.1	$\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt signifikant die Aktivität der konstitutiv aktiven Mutante $\beta$ -Catenin S33Y .....	62
5.2.2	Im Gegensatz zur Inhibierung der GSK3- $\beta$ -Aktivität führt die $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Expression nicht zu einer Akkumulation von $\beta$ -Catenin .....	64
5.3	In Abhängigkeit von Tcf-4 beeinflusst $\Delta$ Np63 $\alpha$ die intrazelluläre Lokalisation von $\beta$ -Catenin .....	67
5.3.1	Die intrazelluläre Lokalisation von $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta$ Np63 $\alpha$ .....	67
5.3.2	Die Expression von Tcf-4 führt zur Relokalisation von zytoplasmatischem $\beta$ -Catenin in den Zellkern .....	69
5.3.3	$\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt die Tcf-4-vermittelte Relokalisation von $\beta$ -Catenin .....	71
5.4	Der Komplex aus $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt die Aktivierung der $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkription .....	74

5.4.1	Die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription wird durch die Koexpression der Proteine $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt .....	74
5.4.2	Tcf-4 bildet einen Proteinkomplex mit $\beta$ -Catenin und mit $\Delta$ Np63 $\alpha$ .....	77
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>81</b>
6.1	$\Delta$ Np63 $\alpha$ : ein spezifischer Aktivator der CRT .....	82
6.2	Ein ternärer Transkriptionskomplex: $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta$ Np63 $\alpha$ .....	85
6.3	Ausblick: Der Tcf-4- $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Proteinkomplex .....	89
6.4	Physiologische Relevanz: Zusammenspiel von $\Delta$ Np63 $\alpha$ und $\beta$ -Catenin .....	90
6.5	p63 – ein multifunktionales Protein .....	93
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	
	<b>Adenovirus Typ 2 und Typ 5 E1A wird unterschiedlich stark exprimiert.....</b>	<b>94</b>
7.1	Zusammenfassung .....	94
7.2	Einleitung .....	95
7.2.1	Fragestellung.....	97
7.3	Material & Methoden.....	97
7.3.1	Zellen.....	97
7.3.2	Viren.....	97
7.3.3	Virusinfektion.....	97
7.3.4	Virusaufzucht.....	98
7.3.5	Replikationsvergleich .....	98
7.3.6	Virustitration .....	98
7.3.6.1	Antikörper für die Virustitration .....	99
7.3.7	Auftrennung und Visualisierung von Proteinen .....	99
7.3.7.1	Antikörper für den WB .....	99
7.3.8	RNA Isolierung .....	99
7.3.9	Isolierung genomischer DNA.....	99
7.3.10	Semiquantitative RT-PCR.....	100
7.3.10.1	Oligonukleotide.....	101
7.3.11	Semiquantitative PCR.....	101
7.4	Ergebnisse .....	101
7.5	Diskussion.....	107
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>109</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.

$\alpha$	anti
Ad2	Adenovirus Serotyp 2
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
ADULT	Acro-Dermato-Ungual-Lacrima-Tooth
AEC	Ankyloblepharon, Ectodermal dysplasia, Clefting
AK	Antikörper
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Arm	Armadillo
AS	Aminosäure
BMP	Bone Morphogenic Protein
bp	Basenpaare
C-	carboxy-
CBD	$\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne
Ci	Cubitus interruptus
CK-1	Casein-Kinase-1
CRT	$\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription
CtBP	C-terminal Binding Protein
d(H <sub>2</sub> O)	deionisiert
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
Dvl	Dishevelled
EEC	Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia, Clefting



## Abkürzungsverzeichnis

---

f.f.u.	fluorescence forming units
Fz	Frizzled
<i>Gen</i> <sup>-/-</sup>	Gendefizienz, Knock-out
GSK3-β	Glykogen-Synthetase-Kinase-3β
HDAC	Histondeacetylase
HMG	High Mobility Group
HPV	Human Papilloma Virus
IP	Immunpräzipitation
Lgs	Legless
LMS	Limb Mammary Syndrome
LRP-5/6	Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein
m.o.i.	multiplicity of infection
mock	Scheininfection
N-	amino-
NC	Nitrocellulose
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
OD	Oligomerisierungsdomäne
OD <sub>260</sub> , OD <sub>280</sub>	Optische Dichte bei 260nm bzw. 280nm
p.i.	post infection
p.t.	post transfection
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pan	Pangolin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
Ptc	Patched
Pyg	Pygopus
RLU	relative light unit
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

---

RT	Raumtemperatur
SAM	steriles $\alpha$ -Motiv
SHFM	non-syndromic Split Hand - split Foot Malformation
Shh	Sonic-Hedgehog
Smo	Smoothened
ss	einzelsträngig
SV40	Simian Virus 40
T-Ag	T-Antigen
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAD2	Transaktivierungsdomäne 2
TID	post-SAM-, inhibitorische Domäne
ÜNK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
VT	Volumenteil
v/v	volume per volume
WB	Western Blot
Wg	Wingless
Wnt	Wingless/int
wt	Wildtyp bzw. wildtypisch
w/v	weight per volume
YY1	Yin Yang 1

# 1 Zusammenfassung

Das *p63*-Gen kodiert für verschiedene Isoformen von p53-homologen Proteinen. *p63*, hauptsächlich  $\Delta Np63\alpha$ , wird in den Stammzellen mehrschichtiger Plattenepithelien exprimiert und fungiert dort als Schlüsselregulator von Proliferation und Differenzierung. Auch maligne Tumoren der Epidermis, des Urothels und der Zervix uteri weisen meist eine hohe *p63*-Expression auf. Neben der Regulation p53-responsiver Gene modulieren *p63*-Proteine die Transkription spezifischer Gene durch weitgehend unbekannte Mechanismen. So konnte gezeigt werden, dass  $\Delta Np63\alpha$  die Aktivität  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsiver Promotoren verstärkt.  $\beta$ -Catenin ist ein multifunktionales Protein, das u.a. als Effektor des kanonischen Wnt-Signalweges, einem bedeutenden Regulator der Zellproliferation während der Entwicklung und Onkogenese, agiert. In Abwesenheit von Wnt-Signalmolekülen wird  $\beta$ -Catenin durch einen Multiproteinkomplex phosphoryliert und damit dem proteolytischen Abbau zugeführt. Die Bindung von Wnt-Liganden an Zelloberflächenrezeptoren setzt eine Signalkaskade in Gang, die zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern führt. Dort aktiviert es zusammen mit den Proteinen der Tcf/Lef-Familie die Transkription Wnt-responsiver Gene, wie z.B. *c-Myc* und *Cyclin D1*.

In dieser Arbeit wurde ein Reporterassaysystem verwendet, um die Wirkung von *p63* auf die Aktivität eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-4-responsiven Promotors zu quantifizieren. Mit Hilfe dieses Systems konnten wir zeigen, dass tetrameres  $\Delta Np63\alpha$ , nicht jedoch *p53* und  $\Delta Np73\alpha$ , die Transkription synergistisch mit  $\beta$ -Catenin bzw.  $\beta$ -Catenin und Tcf-4 verstärkt. Physiologische Mutationen wie sie in Keimbahn-Mutationen des *p63*-Gens in humanen Syndromen auftreten, heben dagegen die Funktion von  $\Delta Np63\alpha$  auf. In Gegenwart von konstitutiv aktivem  $\beta$ -Catenin aktiviert  $\Delta Np63\alpha$  die Transkription des Reportergens synergistisch. Unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper beobachteten wir entsprechend, dass *p63* die Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge von  $\beta$ -Catenin nicht beeinflusst. Durch Koimmunpräzipitation fanden wir heraus, dass  $\Delta Np63\alpha$  einen Komplex mit Tcf-4 bildet. Die Komplexbildung erfolgt auch zwischen  $\Delta Np63\alpha$  und  $\Delta NTcf-4$ , dem die  $\beta$ -Catenin-bindende Domäne fehlt. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass Tcf-4 simultan mit  $\beta$ -Catenin und  $\Delta Np63\alpha$  interagiert. Zudem könnte ein ternärer Komplex die von uns beobachtete Tcf-4-vermittelte Akkumulation von nukleärem  $\beta$ -Catenin in Anwesenheit von  $\Delta Np63\alpha$  über dessen Retention im Zellkern erklären.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass  $\Delta Np63\alpha$  als unmittelbarer Aktivator der  $\beta$ -Catenin-vermittelten Transkription fungiert. Aufgrund unserer Beobachtungen vermuten wir, dass  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta Np63\alpha$  einen aktiven Transkriptionskomplex bilden und durch die Rekrutierung spezifischer Transkriptionskofaktoren gemeinsam die Transkription Wnt-responsiver Gene aktivieren. Damit hätte *p63* das Potential, über Tcf-4 in den kanonischen Wnt-Signalweg einzugreifen und sowohl entwicklungsbiologische Prozesse zu regulieren, als auch die Onkogenese durch Deregulation des Signalweges zu induzieren.

## 2 Einleitung

### 2.1 Der Tumorsuppressor p53

Das p53 Protein wurde erstmals 1979 von verschiedenen Arbeitsgruppen als Interaktionspartner des *Simian Virus 40* (SV40) T-Antigens (T-Ag) beschrieben (Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979) und ist seitdem Objekt intensivster Forschung. Während p53 anfangs für ein potentiell Onkogen gehalten wurde, gilt es heute als *bona fide* Tumorsuppressor. Dies belegt u.a. die Untersuchung von *p53*-null (*p53*<sup>-/-</sup>) Mäusen, die eine erhöhte Onkogenese aufwiesen (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994). In ca. 50% der humanen Tumoren liegt eine Mutation des *p53* Gens vor. Desweiteren kann p53 in Tumoren indirekt über die Bindung viraler Proteine oder durch Veränderungen in Genen, deren Produkte direkt oder indirekt mit p53 in Wechselwirkung stehen, inaktiviert sein.

Das humane *p53*-Gen liegt auf Chromosom 17p13.1 und kodiert für ein 393 Aminosäuren (AS) umfassendes Protein. Die kennzeichnenden Domänen des p53 Proteins sind eine saure aminoterminal (N-terminale) Transaktivierungsdomäne (TAD, AS 1-42), eine zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD, AS 102-292) und eine carboxyterminale (C-terminale) Oligomerisierungsdomäne (OD, AS 324-355). Zwei mal zwei p53 Moleküle bilden über ihre OD Homotetramere (Dimere eines Dimers) aus. Diese binden über ihre DBD an die Konsensussequenz 5'RRRC(A/T)(T/A)GYYYN<sub>0-13</sub>RRRC(A/T)(T/A)GYYY3' p53-responsiver Promotoren. Der basale Transkriptionskomplex für die Initiation der Transkription wird über die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren (u.a. des TATA-Box binding protein, TBP, (Horikoshi et al., 1995) und verschiedener Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIID (Lu and Levine, 1995; Thut et al., 1995)) an die TAD von p53 gebildet. Damit wird die Transkription der Zielgene eingeleitet (Levine, 1997).

Unter normalen Bedingungen liegt p53 inaktiv in geringen Konzentrationen in der Zelle vor. Durch zellulären Stress akkumuliert aktives p53, bindet an p53-responsive DNA-Elemente und induziert die Expression der angrenzenden Gene. Die Aktivierung des Tumorsuppressors erfolgt über drei Hauptsignalwege: a) durch DNA-Schäden (ionisierende Strahlung über ATM und CHK2 (Carr, 2000)), b) durch Onkogene (Ras, Myc über p14<sup>ARF</sup> (Lowe and Lin, 2000; Sherr and Weber, 2000)) und c) durch Chemotherapeutika, UV-Strahlung und Proteinkinaseinhibitoren (über ATR und CKII (Meek, 1999)). Daraufhin wird der Abbau von p53 gestoppt, es wird stabilisiert und akkumuliert in der Zelle. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch Hypoxie zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 führt (Graeber et al., 1996). Die Menge an zellulärem p53 wird hauptsächlich über das Maß an dessen proteolytischen Abbaus bestimmt. Die Zelle hat selbstregulierende Rückkopplungs-

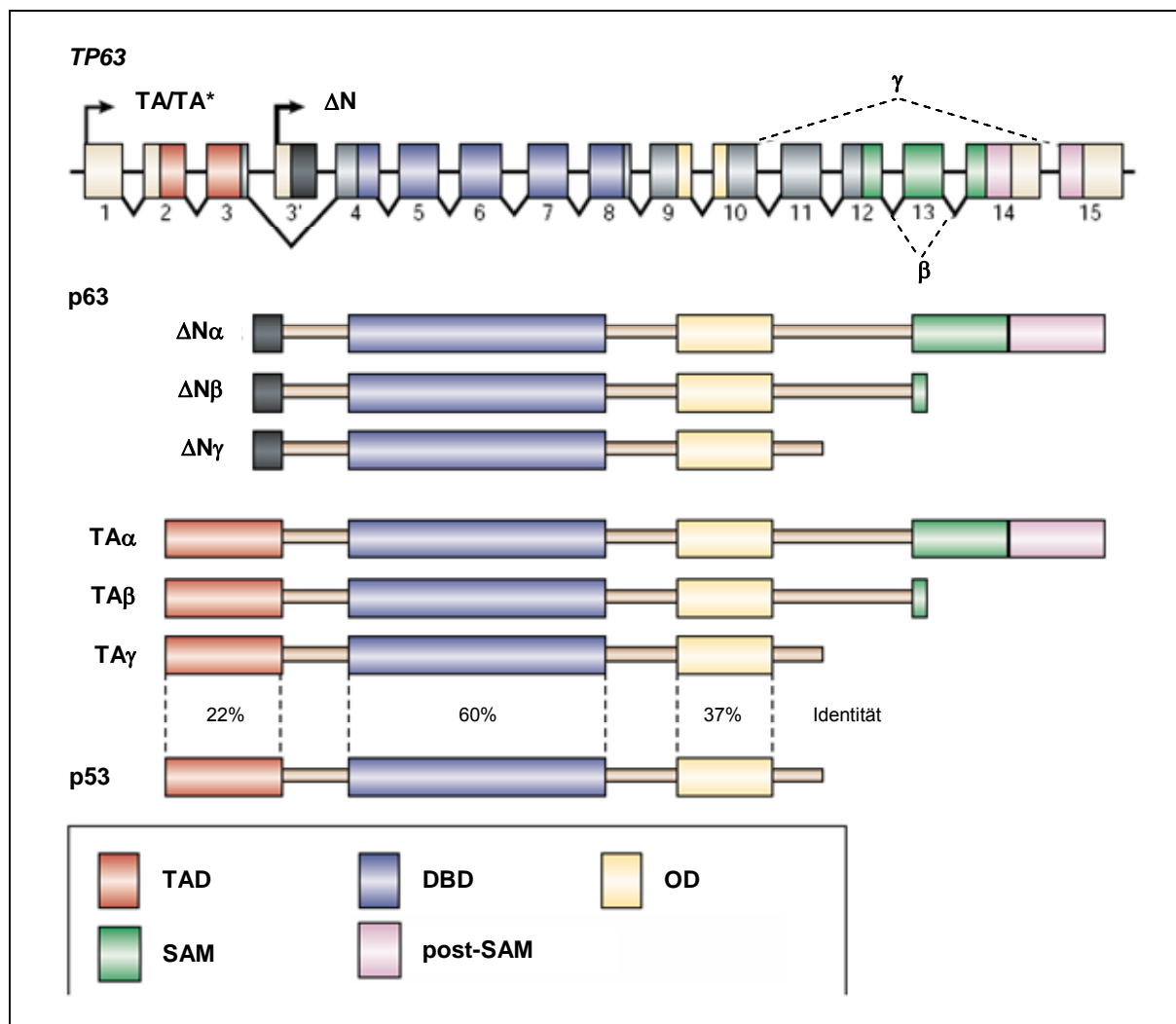
mechanismen (*autoregulatory feedback loops*) entwickelt, die die Stabilität und die Funktion von p53 kontrollieren. Das Produkt eines p53-responsiven Gens, die MDM2 Ubiquitin-Ligase, ist am proteosomalen Abbau von p53 beteiligt (Wu et al., 1993). Dagegen ist das p53-responsive  $\Delta Np73$  ein funktioneller p53-Antagonist.  $\Delta Np73$  bindet an p53-responsive Promotoren und verhindert die Expression p53-responsiver Gene (Kartasheva et al., 2002). Die Aktivierung von p53 erfordert zusätzlich Konformationsänderungen im Protein, die durch verschiedene posttranslationale Modifikationen erreicht werden. Mögliche posttranslationale Modifikationen sind: Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Ribosylierung, Methylierung, Ubiquitylierung, Neddylierung, Sumoylierung (Bode and Dong, 2004) und ISGylierung (Drewelus, 2005). Daneben binden zahlreiche Proteine an p53, die es stabilisieren und aktivieren (Prives and Hall, 1999). p53-responsive Gene induzieren eine Vielzahl von Genen mit unterschiedlichen Funktionen: sie induzieren den Zellzyklusarrest (z.B.  $p21^{WAF1/CIP1}$ ), die Apoptose (z.B. *Bax*), die Seneszenz (z.B. *Ras*) und die DNA-Reparatur (z.B. *PCNA*), sie inhibieren die Angiogenese (z.B. *Maspin*) und beeinflussen die Transkription, die Signaltransduktion, den oxidativen Stress und den Proteinmetabolismus (Gomez-Lazaro et al., 2004).

Daneben werden etliche Gene durch p53 reprimiert. Teilweise ist der zugrunde liegende Mechanismus der Repression unklar. Für die Repression des *Survivin*-Gens konnte gezeigt werden, dass p53 dessen Repression über die direkte transkriptionelle Aktivierung eines Effektorgens,  $p21^{WAF1/CIP1}$ , vermittelt (Lohr et al., 2003).

Der Tumorsuppressor p53 hemmt die genetische Instabilität und bewahrt die genomische Integrität der Zelle und wird deshalb auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992).

## 2.2 p63 und p73 als Homologe von p53

Die *p63*- und *p73*-Gene kodieren für Proteine mit bemerkenswerter Ähnlichkeit zu dem Tumorsuppressor p53. Das humane *p73*-Gen wurde 1997 entdeckt und liegt auf Chromosom 1p36.3 (Kaghad et al., 1997). Kurz darauf wurde 1998 unabhängig von verschiedenen Gruppen das humane *p63*-Gen (*p40*, *p51*, *p73L*, *AIS*, *CUSP*, *KET*) auf Chromosom 3q27-29 entdeckt (Augustin et al., 1998; Lee et al., 1999; Osada et al., 1998; Senoo et al., 1998; Trink et al., 1998; Yang et al., 1998). Die Produkte beider Gene weisen wie p53 eine saure N-terminale TAD, eine zentrale DBD und eine C-terminale OD auf. Aufgrund der starken AS-Homologie zwischen den DBD von p53, p63 und p73 wurden die Proteine in eine Proteinfamilie eingeordnet (Kaghad et al., 1997; Osada et al., 1998; Trink et al., 1998; Yang et al., 1998).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der p63 Genstruktur und der p63-Isoformen**

Das *p63*-Gen liegt auf Chromosom 3q27-29 und enthält 15 Exons. Zwei separate Promotoren führen zur Expression von Proteinen, die eine TAD enthalten (TA/TA\*-Isoformen) und Proteinen, denen die TAD fehlt (ΔN-Isoformen). (TA\*p63 ist eine um 39AS N-terminal verlängerte Isoform von TAp63, die durch die Verwendung eines alternativen Startkodons translatiert wird und dem humanen KET-Protein entspricht (Augustin et al., 1998).) Zusätzlich entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA Isoformen mit unterschiedlichen C-Termini (α, β, γ). Die Exons, die für die TAD, DBD und OD kodieren, sowie die entsprechenden Proteindomänen sind in der Abbildung farblich hervorgehoben. Die Sequenzidentität der funktionellen Domänen von p63 und p53 ist angezeigt. Abbildung in Anlehnung an Yang and McKeon (Yang and McKeon, 2000).

Vergleicht man p63 und p73 mit p53 so ergeben sich folgende Aminosäurehomologien innerhalb der Proteindomänen: TAD – die AS 1-59 von p63 und die AS 1-54 von p73 sind zu 22% bzw. zu 29% identisch mit den AS 1-45 von p53. DBD – die AS 142-321 von p63 und die AS 131-310 von p73 sind zu 60% bzw. zu 63% identisch mit den AS 113-290 von p53. OD – die AS 353-397 von p63 und die AS 345-390 von p73 sind zu 37% bzw. zu 38% identisch mit den AS 319-363 von p53. Insgesamt sind p63 und p73 zueinander homologer als zu p53. Innerhalb der TAD sind p63 und p73 zu 30%, innerhalb der DBD zu 87% und innerhalb der OD zu 65% identisch (Chen, 1999). Phylogenetische Analysen von p53, p63

und p73 legen die Vermutung nahe, dass p63 das primitivste und älteste Mitglied und damit der Urahn der p53-Familie ist. So sind murines und humanes p63 zu 99% identisch, d.h., innerhalb von 483 AS treten lediglich 8 AS-Substitutionen auf (Yang et al., 1998).

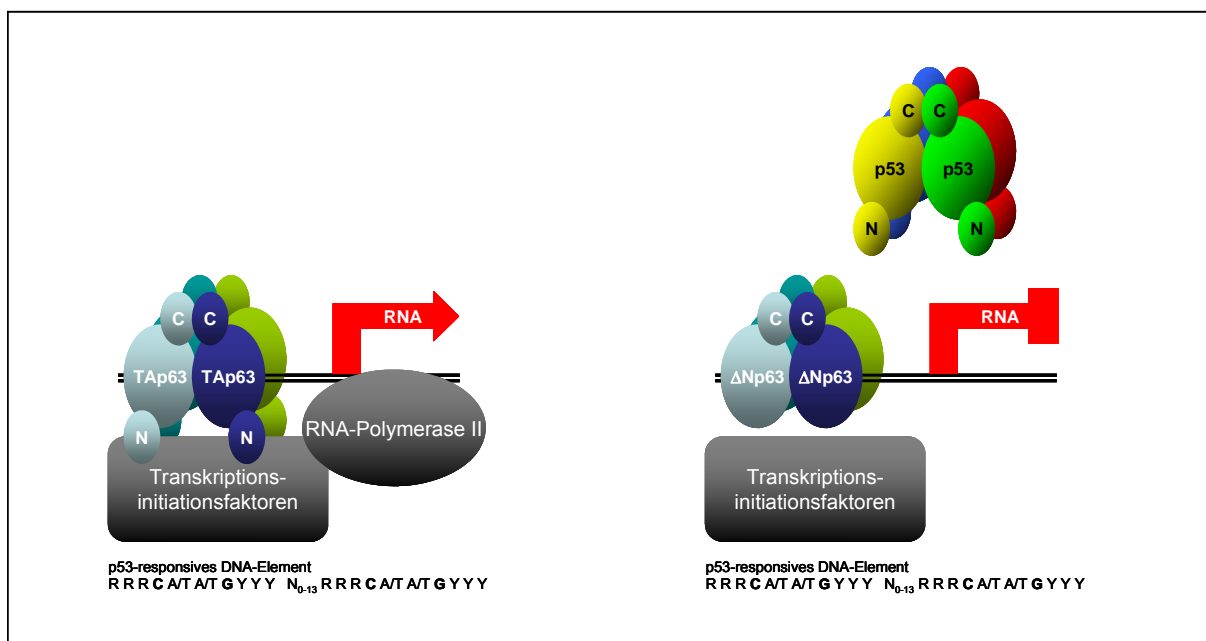
Im Vergleich zum p53-Gen sind die p63- und p73-Gene sehr komplex und kodieren für Proteine, die einerseits p53 funktionell nachahmen, andererseits aber auch p53 entgegenwirken. Sowohl das p63- als auch das p73-Gen enthalten zwei unabhängige Promotoren, deren Transkripte dem differentiellen Spleißen unterzogen werden. In Abbildung 1 ist die Struktur des p63-Gens und die daraus resultierenden Proteine schematisch dargestellt. Die zwei Promotoren (TA,  $\Delta N$ ) führen zur Transkription und Translation von zwei Formen von Proteinen: TAp63/TAp73-Isoformen enthalten analog zu p53 eine N-terminale TAD,  $\Delta Np63/\Delta Np73$ -Isoformen besitzen einen verkürzten N-Terminus ohne TAD. Bei p63 unterscheidet man zusätzlich zwischen einer TAp63- und einer TA\*p63-Isoform. TA\*p63 wird ausgehend von einem alternativen Startkodon translatiert und ist eine N-terminal um 39 AS verlängerte Isoform von TAp63. TA\*p63 entspricht dem humanen KET-Protein (Augustin et al., 1998; Yang et al., 1998). Durch differentielles Spleißen der von den zwei Promotoren ausgehenden Transkripte, werden Proteine mit unterschiedlichen C-Termini exprimiert. Dabei bleiben die DBD und die OD unberührt. p63 $\alpha$ /p73 $\alpha$ -Isoformen kodieren am C-Terminus für ein steriles  $\alpha$ -Motiv (SAM) (Thanos and Bowie, 1999). Diese Proteindomäne ist ein Protein-Protein-Interaktionsmodul, das erstmals in verschiedenen eukaryotischen Proteinen aus *Saccharomyces* und *Drosophila* identifiziert wurde, die eine Rolle bei der Entwicklung und bei der Signaltransduktion spielen (Ponting, 1995; Schultz et al., 1997). Proteine, die eine SAM-Domäne enthalten, bilden über diese und ähnliche SAM-Domänen in hohem Maße Homo- und Heterooligomere aus. Ein Beispiel dafür ist der Ephrin-Rezeptor, der über die Homodimerisierung der SAM-Domänen aktiviert wird (Stapleton et al., 1999; Thanos et al., 1999). Aktuelle Daten weisen zudem darauf hin, dass einige SAM-Domänen auch mit RNA interagieren können (Kim and Bowie, 2003). Die SAM-Domänen von p63 $\alpha$  und p73 $\alpha$  liegen als Monomere vor (Chi et al., 1999; Cicero et al., 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Proteine über die SAM-Domäne mit bisher noch nicht identifizierten regulatorischen Proteinen oder mit RNA interagieren. So konnte in transienten Experimenten gezeigt werden, dass die TAp63 $\alpha$ -Isoform über die SAM-Domäne einen dominant inhibitorischen Effekt auf die Transaktivierung p53-responsiver Gene ausübt (Ghioni et al., 2002; Osada et al., 1998; Yang et al., 1998). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch die letzten ~70 AS (post-SAM-Domäne, TID) von TAp63 $\alpha$  und TAp73 $\alpha$  nötig und ausreichend sind, um die transaktivierende Funktion der Proteine zu inhibieren (Ozaki et al., 1999; Serber et al., 2002). Dies geschieht durch die sterische Interaktion der TID mit der N-terminalen TAD von TAp63 $\alpha$ . Die p63 $\beta$ /p73 $\beta$ -Isoformen sind im Vergleich zu den  $\alpha$ -Isoformen C-terminal um die TID und einen Großteil der SAM-Domäne verkürzt.

	p53	p63	p73
<u>Proteinstruktur</u>	N-terminale Trans-aktivierungsdomäne, zentrale DNA-Bindungsdomäne, C-terminale Oligomerisierungsdomäne	N-terminale Trans-aktivierungsdomäne (nur TAp63, nicht $\Delta$ Np63), zentrale DNA-Bindungsdomäne, C-terminale Oligomerisierungsdomäne, SAM-Domäne (nur p63 $\alpha$ )	N-terminale Trans-aktivierungsdomäne (nur TAp73, nicht $\Delta$ Np73), zentrale DNA-Bindungsdomäne, C-terminale Oligomerisierungsdomäne, SAM-Domäne (nur p73 $\alpha$ )
<u>Transkriptionsregulation</u>			
p53-responsive Gene	Promotorbindung und Aktivierung	Promotorbindung, TAp63 Aktivierung, $\Delta$ Np63 Inhibierung	Promotorbindung, TAp73 Aktivierung, $\Delta$ Np73 Inhibierung
p53-unabhängige Gene	keine Regulation	spezifische Transkriptionsregulation durch p63- und/oder p73-Isoformen	
<u>Gewebespezifische Expression</u>	ubiquitär	in mehrschichtigen Plattenepithelien, speziell der Haut (Stammzellkompartiment)	in Regionen des zentralen Nervensystems (Stammzellkompartiment)
<u>Knock-out-Mäuse</u>	frühzeitige Entstehung von Tumoren, selten Exencephalie und andere Entwicklungsstörungen	neonataler Tod, Abwesenheit von Gliedmaßen, Abwesenheit der Epidermis und anderer Plattenepithelien, Abwesenheit des Urothels und sekretorischer Epithelien	körperliche Wachstumsverzögerung, Sinus- und Mittelohrentzündungen/infektionen, Hydrocephalus, gastrointestinale Hämorrhagien, Störungen im reproduktiven und sozialen Verhalten, hippocampale Dysgenese
<u>Humane Syndrome</u>	Li-Fraumeni: Prädisposition für Tumorerkrankungen, heterozygot, autosomal dominant vererbt	EEC, AEC, ADULT, LMS, SHFM: Entwicklungsstörungen der Gliedmaßen und/oder ectodermale Dysplasien, heterozygot, autosomal dominant vererbt	nicht bekannt
<u>Onkogenese</u>			
tumorspezifische Mutationen	<i>p53</i> ist das am häufigsten mutierte Gen in Tumoren	Mutationen sehr selten, kausale Rolle nicht geklärt	Mutationen sehr selten, kausale Rolle nicht geklärt
tumorspezifische Expression	mutiertes p53	Expression von $\Delta$ Np63 in Plattenepithelkarzinomen	stärkere Expression von p73 in Neuroblastomen, Mammakarzinomen und Ovarialkarzinomen (in einigen Fällen spezifisch von $\Delta$ Np73 und $\Delta$ TAp73)
Transformation	mutiertes p53 in Kooperation mit aktiviertem Ras	keine Daten, aber: $\Delta$ Np63-Expression verstärkt die Koloniebildung in Rat1a-Zellen	$\Delta$ Np73 in Kooperation mit aktiviertem Ras
<u>Assoziation mit viralen Onkoproteinen</u>			
Adenovirus E1B-55kDa	Assoziation	keine Daten	keine Assoziation
HPV E6	Assoziation	keine Assoziation	keine Assoziation
SV40 Großes T-Ag	Assoziation	keine Assoziation	keine Assoziation

**Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von p63 und p73 mit p53 (Blandino and Dobbelsstein, 2004; Mills, 2006; Yang and McKeon, 2000).**



Ghioni *et al.* konnten innerhalb der p63-Proteine eine zweite Aktivierungsdomäne (TAD2) korrespondierend zu den Exons 11-12 identifizieren (Ghioni *et al.*, 2002). Die TAD2 unterstützt vermutlich die Promoteraktivierung durch die p63 $\beta$ /p73 $\beta$ -Isoformen. p53 am ähnlichsten sind TAp63 $\gamma$  und TAp73 $\gamma$ . Im Vergleich zu p53 sind die p63 $\gamma$ -Isoformen C-terminal lediglich um eine kurze Polyglutamatkette verlängert. Einige Eigenschaften von p63 und p73 sind im Vergleich zu p53 in Tabelle 1 zusammengefasst. Allgemein lässt sich feststellen, dass die TAp63/TAp73-Isoformen p53-responsive Reportergene und traditionelle p53-Zielgene (*p21*, *GADD45*, *Bax*, *MDM2*) aktivieren, sowie in transienten Experimenten nach Überexpression in Säugerzellen Apoptose induzieren. Dagegen sind die  $\Delta$ Np63/ $\Delta$ Np73-Isoformen starke Antagonisten von p53. In Transkriptionsexperimenten inhibieren sie sowohl die Funktion von p53 als auch die der TAp63/TAp73-Isoformen. Dabei ergibt sich die dominant negative Aktivität der  $\Delta$ N-Isoformen sowohl aus deren Konkurrenz mit den Transkriptionsaktivatoren um DNA-Bindungsstellen als auch durch die Sequestration von p53-, TAp63- und TAp73-Homotetrameren durch die Bildung inaktiver Heterooligomere. Durch die Überexpression der p53-Homologen und anschließender cDNA-Array-Hybridisierung wurden zudem etliche Gene gefunden, die spezifisch durch p63 und/oder p73 reguliert werden, jedoch nicht p53-responsiv sind (Blandino and Dobbelstein, 2004; Yang and McKeon, 2000).

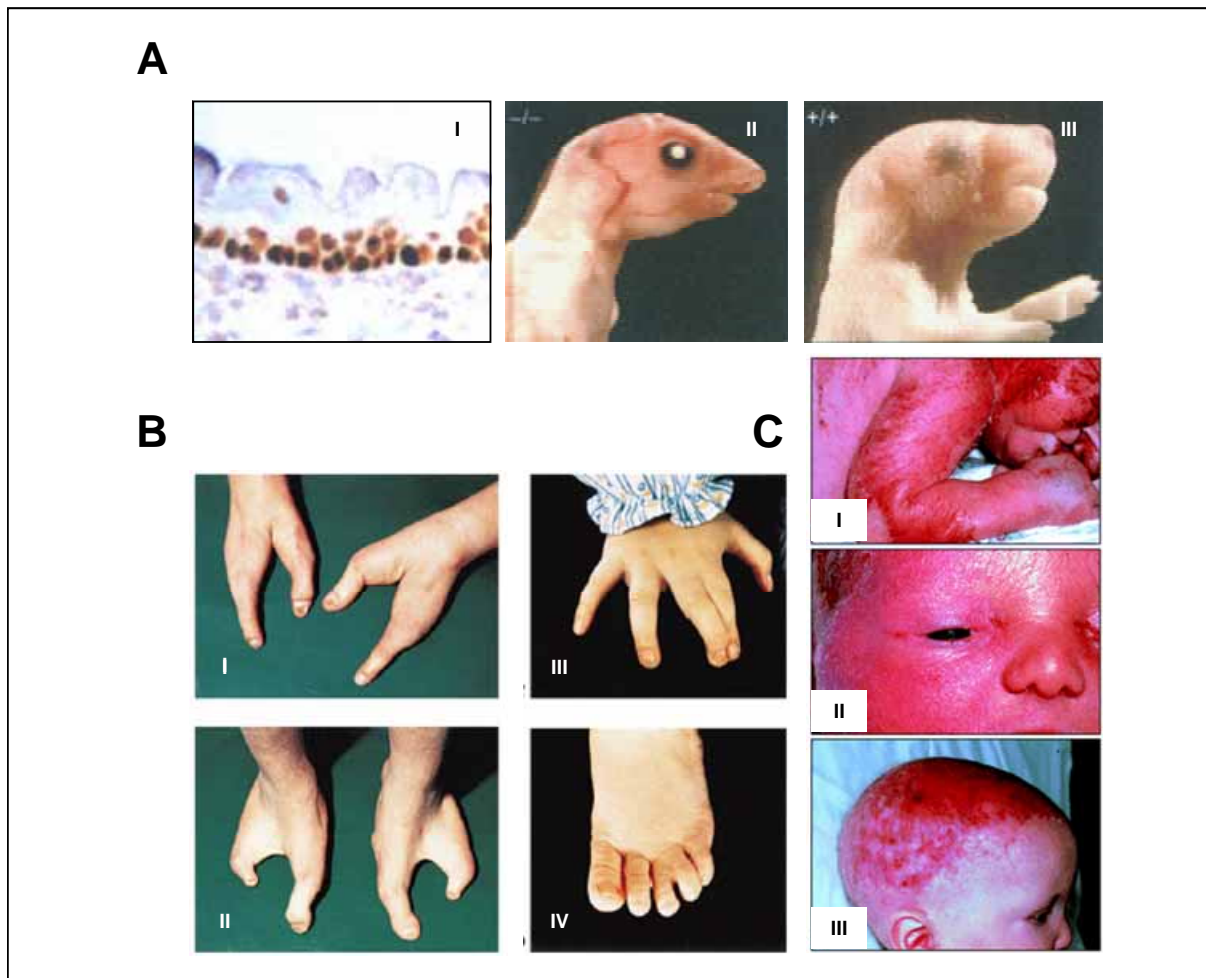


**Abbildung 2: TAp63 versus  $\Delta$ Np63 – transkriptioneller Aktivator versus Repressor.**

Sowohl TAp63- als auch  $\Delta$ Np63-Tetramere binden an responsive DNA-Elemente und p53-responsive Promotoren. Während TAp63 die Transkription der anliegenden Gene aktiviert, reprimiert  $\Delta$ Np63 die Transkription und antagonisiert TAp63 bzw. p53.

## 2.3 Die Rolle von p63 im Organismus

### 2.3.1 p63-defiziente Tiermodelle und humane p63-Syndrome



**Abbildung 3: Die physiologische Relevanz von p63 bei der Entwicklung der Haut und in humanen Syndromen.**

(A): I) p63-Färbung eines perinatalen Gewebeschnittes der Epidermis einer wt Maus. p63 wird in den basalen Zellen der Epidermis exprimiert. II) und III) Vergleich einer  $p63^{-/-}$ -Maus (II) mit einer wt Maus (III) am Tag 1 postnatal. Die  $p63^{-/-}$ -Maus weist im Gegensatz zur wt Maus hypoplastische Ober- und Unterkiefer auf, besitzt keine Augenlider, keine Haut und keine Hautanhangsgebilde. Die Abbildungen wurden der Veröffentlichung von Yang *et al.* (1999) entnommen (Yang *et al.*, 1999). (B): Entwicklungsdefekte in EEC-Syndrom-Patienten. I) und II) Spalthände mit dystrophen Nägeln der Daumen (I) und Spaltfüße (II). III) und IV) Kutane Verwachsung des zweiten und dritten Fingers der rechten Hand (III) und teilweise Verwachsung des dritten und vierten Zehs am linken Fuß (IV) eines Patienten. Die Abbildungen wurden der Veröffentlichung von Celli *et al.* (1999) entnommen (Celli *et al.*, 1999). (C): Entwicklungsdefekte in AEC-Syndrom-Patienten. I) Ein Neugeborenes mit Hauterythem, Erosionen und Lippen/Gaumenspalte. II) Ein Neugeborenes mit partieller Fusion der Augenlider. III) Ein 18 Monate altes Baby mit ausgeprägter erosiver Kopfhautentzündung und Alopezie. Die Abbildungen wurden der Veröffentlichung von McGrath *et al.* (2001) entnommen (McGrath *et al.*, 2001).

p63-defiziente Tiermodelle haben in der Vergangenheit Einblick in die zell- und gewebespezifische Expression und die physiologische Funktion von p63 im Organismus gegeben. Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten wildtypischen (wt)

Mausembryonen konnten die Expression von p63 in basalen Zellschichten und Vorläuferzellschichten vieler epithelialer Gewebe, u.a. der Epidermis, der Gebärmutter, des Urogenitaltraktes, der Prostata, des Myoepitheliums der Brust und anderer Drüsengewebe, nachweisen (Tabelle 1, Abbildung 3A). Weiterführende Analysen der RNA-Expression zeigten, dass es sich dabei hauptsächlich um  $\Delta Np63\alpha$  handelt (Yang et al., 1998). Darüber hinaus gilt p63 als Stammzellenmarker, da eine Korrelation zwischen der Expression von p63 und dem proliferativen Potential verschiedener Keratinozytenstadien besteht (Pellegrini et al., 2001).

*p63*<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlen alle mehrschichtigen Plattenepithelien und ihre Anhangsgebilde einschließlich der Brust-, Tränen- und Speicheldrüsen. Die Tiere dehydrieren und sterben kurz nach der Geburt. Zusätzlich weisen die Mäuse Fehlentwicklungen der Extremitäten und des Gesichtsschädels auf (Abbildung 3A). Sie entwickeln verstümmelte Gliedmaßen, Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten und ihnen fehlen Zähne (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). In einem weiteren Tiermodell konnten Koster et al. zeigen, dass die Expression von p63 in einschichtigem Lungenepithelium in der Entstehung eines mehrschichtigen Plattenepitheliums resultiert (Koster et al., 2004). Der spezifische Knockdown von  $\Delta Np63$  im Zebrafisch (*Danio rerio*) verhindert die epidermale Morphogenese und führt zur Entwicklung verstümmelter Flossen (Bakkers et al., 2002; Lee and Kimelman, 2002).

Neben *p63*-defizienten Tiermodellen haben Untersuchungen humaner Syndrome, die durch heterozygote Keimbahnmutationen im *p63*-Gen verursacht werden, einen Einblick in die Funktion von p63 gegeben. Bis heute wurden fünf *p63*-Syndrome beschrieben, die mit schwerwiegenden Entwicklungsdefekten einhergehen. Patienten mit einem EEC-Syndrom weisen Anomalien der mittleren Abschnitte von Händen und Füßen auf („Ectrodactyly“, Spalthand und Spaltfuß), Dyshidrose, Dysplasie der Nägel, Haare und Zähne („Ectodermal dysplasia“) und Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten („Clefting“) (Abbildung 3B) (Celli et al., 1999). Celli et al. konnte zeigen, dass diese Patienten eine Punktmutation innerhalb der DBD von p63 tragen und alle EEC-Punktmutationen homolog zu bekannten tumorspezifischen p53-Mutationen sind (Celli et al., 1999). Das AEC- („Ankyl<sup>o</sup>blepharon-Ectodermal dysplasia-Clefting“) oder Hay-Wells-Syndrom wird durch Punktmutationen innerhalb der SAM-Domäne von p63 hervorgerufen und ist durch verwachsene Augenlider, Ektodermaldysplasie, Lippen-, Kiefer-, und Gaumenspalte gekennzeichnet (Abbildung 3C) (McGrath et al., 2001). Daneben gibt es noch das ADULT-Syndrom („Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth“), SHFM („non-syndromic Split Hand - split Foot Malformation“) und das LMS-Syndrom („Limb Mammary Sndrome“), die mit *p63*-Mutationen assoziiert sind (van Bokhoven and McKeon, 2002). Vergleicht man diese Syndrome, repräsentieren sie alle ektodermale Fehlentwicklungen. Die heterozygoten Punktmutationen werden autosomal dominant vererbt und resultieren im Vergleich zu *wt* p63 in einem Protein mit dominant negativen

Eigenschaften oder zeigen einen Funktionsgewinn. Signifikant ist auch eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen dem Ort der Mutation und den hervorgerufenen Symptomen.

Aus den Daten der *p63*-defizienten Tiermodelle und der *p63*-Syndrome wird die Funktion von *p63* im Organismus heute wie folgt abgeleitet: Während der Entwicklung wird *p63* hauptsächlich im embryonalen Ektoderm und in den basalen Schichten vieler epithelialer Gewebe exprimiert. Die Strukturen, deren Entwicklung in *p63*<sup>-/-</sup>-Mäusen und in humanen Syndromen betroffen sind, sind von spezialisierten ektodermalen Zellen abgeleitet, die auf einen Signalaustausch mit darunterliegenden mesodermalen Zellen angewiesen sind (Ferguson, 1988). Eine mögliche Funktion von *p63* ist die Regulation der involvierten Signalwege (van Bokhoven and McKeon, 2002).

*p63*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen untersucht, die beide einen vergleichbaren Phänotyp der Mäuse beschrieben haben, deren Interpretation der Funktion von *p63* aber in unterschiedliche Richtungen geht. Mills *et al.* sehen die Funktion von *p63* in der ektodermalen Differenzierung während der Embryogenese (Mills *et al.*, 1999). Yang *et al.* sehen dagegen die Funktion von *p63* in der Aufrechterhaltung der basalen Zellpopulationen und Vorläuferzellpopulationen und damit in der epithelialen Entwicklung und Morphogenese (Yang *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen unterstützen jeweils eine der Hypothesen oder lassen eine Funktion von *p63* vermuten, die beide Hypothesen verknüpft (Barbieri and Pietenpol, 2006). *p63* übt eine entscheidende Funktion in der Kontrolle der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung epithelialer Zellen aus (Barbieri and Pietenpol, 2006; Yang and McKeon, 2000). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Rolle von *p63* innerhalb dieser Prozesse zu klären.

### 2.3.2 *p63* – Tumorsuppressor oder Onkogen ?

Die Rolle von *p63* während der Onkogenese ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. Obwohl *p63* in der Lage ist, *p53*-responsive Gene zu aktivieren (Yang *et al.*, 1998), sind *p63*-Mutationen in Tumoren nur sehr selten zu finden (Hagiwara *et al.*, 1999; Moll, 2003; Osada *et al.*, 1998). Betrachtet man humane *p63*-Syndrome, so vermitteln bekannte *p63*-Mutationen keine Prädisposition für Tumorerkrankungen. Allerdings ist in den meisten Tumoren die *p63*-Expression aufrechterhalten. Häufig ist das *p63*-Gen sogar transkriptionell überexprimiert oder der *p63*-Locus ist amplifiziert (Choi *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2005; Hibi *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2002; Massion *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2000; Tonon *et al.*, 2005).  $\Delta Np63\alpha$  ist als Antagonist von *p53* ein potentielles Onkogen und ist in verschiedenen epithelialen Tumoren überexprimiert (Cui *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1998). Die Überexpression von  $\Delta Np63$  in Rat-1a-Zellen verstärkt das Koloniewachstum der Zellen in Softagar und das Wachstum von

Xenografttumoren in Nacktmäusen (Hibi et al., 2000). Aufgrund der Funktion von  $\Delta Np63\alpha$  bei der Entwicklung wird vermutet, dass es nicht nur die proliferative Kapazität von epithelialen Stammzellen sondern auch die von Tumorzellen erhält (Blandino and Dobbelstein, 2004). p63 ist vermutlich in die Onkogenese involviert, jedoch ist der zugrundeliegende Mechanismus noch aufzuklären (Mills, 2006).

## 2.4 Wnt-Signaltransduktion

Während der Entwicklung kontrollieren verschiedene Signalmoleküle, wie Bone Morphogenic Proteins (BMP), Hedgehogs, Fibroblast Growth Factors (FGF), Schlüsselereignisse der Embryogenese. Dazu gehören auch die Mitglieder der Wnt-Familie. Wnt-Signalmoleküle sind sezernierte Glykoproteine, die an Frizzled (Fz) Transmembranrezeptoren binden und damit Signalkaskaden aktivieren, die sowohl die Entwicklung als auch die Gewebehomöostase regulieren. Eine Störung dieser Signalwege führt zur Entstehung von Krankheiten und Tumoren (Logan and Nusse, 2004).

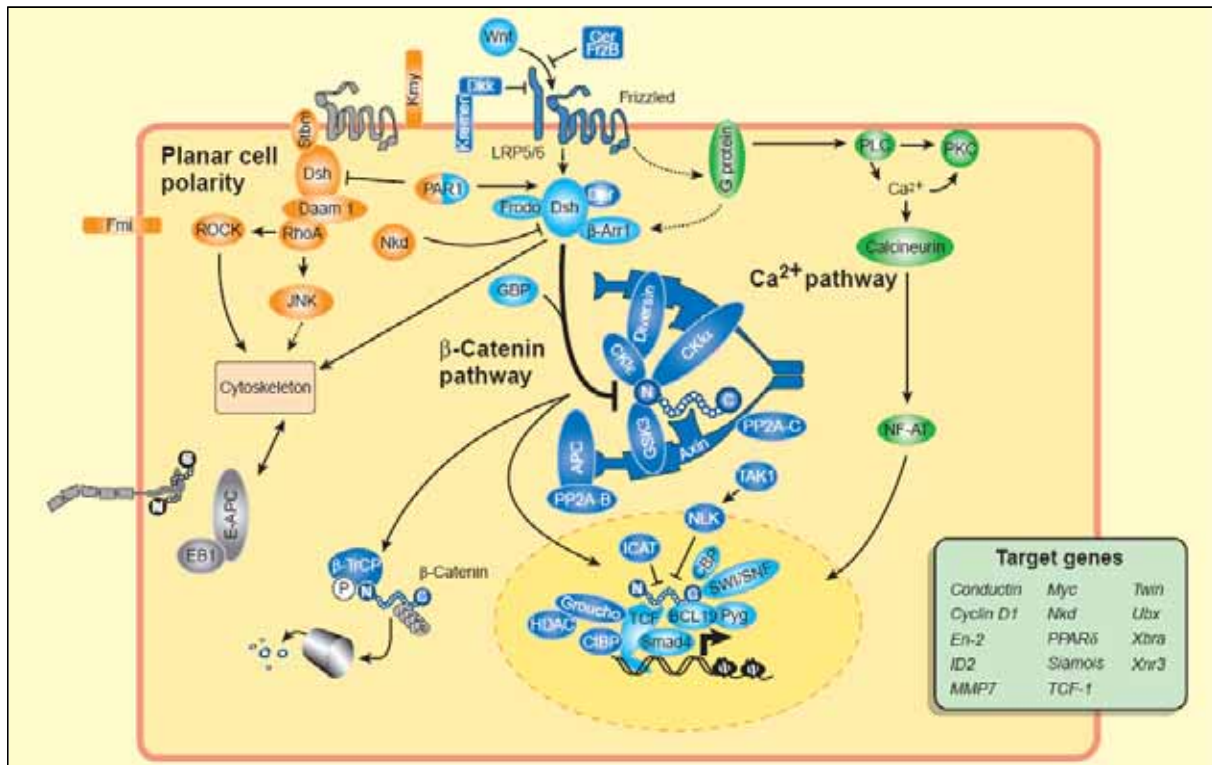
Das erste in Säugern entdeckte Wnt-Gen nannte man *int-1*, da es durch die genomische Integration der Long-Terminal-Repeat-Region des *Mouse mammary tumor virus* aktiviert wurde. Durch die Kombination des Namens mit dem des *Drosophila*-Homologen *Wingless* entstand der Name *Wnt* (Rijsewijk et al., 1987). Bis heute wurden 19 humane und murine Wnt-Gene, sowie 7 Wnt-Gene in *Drosophila melanogaster* und 5 in *Caenorhabditis elegans* beschrieben, die hoch konserviert sind. So weisen z.B. Wnt-Proteine von Säugern und *Drosophila* ähnliche biologische und biochemische Aktivitäten auf (Danielian and McMahon, 1996; Logan and Nusse, 2004). In phylogenetischen Analysen konnten die 19 humanen Wnt-Gene in 12 Subfamilien unterteilt werden. Mindestens 11 dieser Subfamilien sind auch in *Cnidaria* (speziell *Nematostella vectensis*) vorhanden. Das bedeutet, Wnt Subfamilien entstanden sehr früh in der Evolution der Metazoa, wahrscheinlich vor etwa 650 Millionen Jahren (Kusserow et al., 2005).

Wnt-Proteine sind auf AS-Ebene hochkonservierte Proteine mit unterschiedlichen Aktivitäten. Sie regulieren die Zellproliferation, die Zellfunktion und die Zelldifferenzierung (Logan and Nusse, 2004).

### 2.4.1 Wnt-Signalmoleküle regulieren mehrere Signalwege

Einen ersten Hinweis auf unterschiedliche Wnt-induzierte Signalkaskaden ergaben Experimente in *Xenopus laevis*. Während die Expression von XWnt1 und XWnt8 erwartungsgemäß zu einer Duplikation der embryonalen Körperachse führte, verursachte die

Expression von XWnt4, XWnt5a und XWnt11 eine gestörte Konvergenz und Extension der Körperachse, ohne das Schicksal der einzelnen Zelle zu beeinflussen (Du et al., 1995; Moon et al., 1993).



**Abbildung 4: Überblick über die Wnt-Signaltransduktion.**

Das Schema gibt einen Einblick in die Komplexität der intrazellulären Wnt-Signaltransduktion und die Aufteilung in verschiedene Signalwege. Neben dem  $\beta$ -Catenin-Signalweg regulieren Wnt-Proteine den planaren Zellpolaritätssignalweg und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg. Die Abbildung wurde der Veröffentlichung von Huelsken *et al.* (2002) entnommen (Huelsken and Behrens, 2002).

Heute unterscheidet man mindestens drei Zweige der intrazellulären Wnt-Signaltransduktion. Der kanonische Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert Zielgene im Zellkern (s. Kapitel 2.4.2). Der planare Zellpolaritätssignalweg reguliert über RhoA und die Jun N-terminale Kinase (JNK) die asymmetrische Organisation des Zytoskeletts und die koordinierte Polarisierung der Zellen. Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg führt vermutlich über G-Proteine zu einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und reguliert über die Phosphatase Calcineurin den Transkriptionsfaktor NF-AT (Huelsken and Behrens, 2002). In Abbildung 4 ist die Komplexität der Wnt-Signaltransduktion schematisch dargestellt. Die Klassifizierung der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege ist noch nicht abgeschlossen. Es ist schwierig klare Abgrenzungen zwischen den Signalkaskaden zu definieren, da viele Abschnitte überlappen. So kann man nicht genau sagen, wieviele Wnt-Signalwege es gibt. Im Gegensatz zur Regulation von Transkriptionsfaktoren ist bisher wenig über die signalvermittelte Regulation der

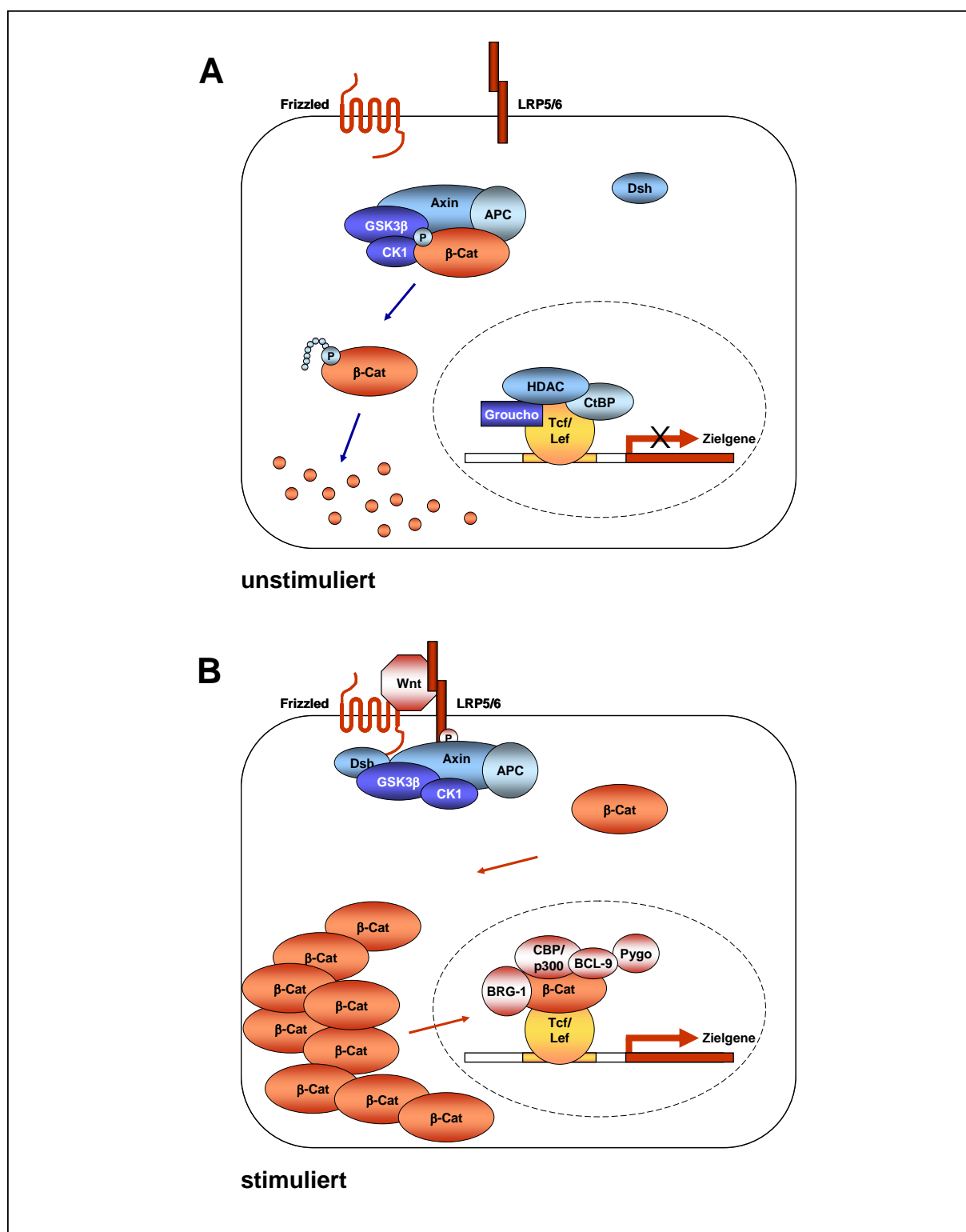
Zellbewegung, der Zellform und der Zellpolarität bekannt. Es bleibt deshalb interessant zu entdecken, in welchem Ausmaß embryonale und adulte Prozesse über nicht-kanonische Signalwege kontrolliert werden (Veeman et al., 2003).

#### 2.4.2 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg reguliert die Aktivität von  $\beta$ -Catenin über dessen zytoplasmatische Akkumulation und nukleäre Translokation.

In Abwesenheit von Wnt-Signalmolekülen bindet  $\beta$ -Catenin an einen Komplex aus Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC), Glykogen-Synthetase-Kinase-3 $\beta$  (GSK3- $\beta$ ) und Casein Kinase-1 (CK-1). CK-1 und GSK3- $\beta$  phosphorylieren sequentiell  $\beta$ -Catenin und markieren es so für die  $\beta$ -TrCP-vermittelte Ubiquitinylierung.  $\beta$ -TrCP ist eine Komponente des SCF-Ubiquitinligasekomplexes und erkennt hyperphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin. Polyubiquitinyliertes  $\beta$ -Catenin wird anschließend durch das 26S-Proteasom abgebaut. Die Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie binden sequenzspezifisch an Tcf/Lef-responsive DNA-Elemente  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-regulierter Gene. In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin befindet sich Tcf/Lef in einem Repressorkomplex zusammen mit Groucho-Faktoren, Histondeacetylasen (HDAC) und dem C-terminal Binding Protein (CtBP) (Abbildung 5A).

Die Bindung von Wnt-Liganden an einen Rezeptorkomplex, bestehend aus einem Mitglied der Fz-Rezeptorfamilie und LRP-5/6 (Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Related Protein), inhibiert die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch den Axin/APC/GSK3- $\beta$ /CK-1-Komplex. Die Assoziation der Wnt-Liganden mit dem Fz/LRP-5/6-Korezeptorkomplex führt zur sequentiellen Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von LRP-5/6 durch GSK3- $\beta$  und CK-1. Daraufhin wird Axin an den phosphorylierten Rezeptorkomplex rekrutiert. Die Funktion von Dishevelled (Dvl) bei der Inhibierung des Axin/APC/GSK3- $\beta$ /CK-1-Komplexes ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Dvl unterstützt vermutlich die Rekrutierung oder Inhibierung des Axin-Proteinkomplexes. Hypophosphoryliertes  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytoplasma der Zelle und wird in den Zellkern transportiert. Dort reguliert es zusammen mit Tcf/Lef Wnt-Zielgene. Dabei verdrängt  $\beta$ -Catenin Groucho-Faktoren von Tcf/Lef und etabliert einen transkriptionell aktiven Proteinkomplex, indem es Transkriptionskofaktoren, wie BCL-9 zusammen mit Pygopus (Pyg), und Chromatin umgestaltende Faktoren, wie die Histonacetylase CBP/p300 und Brg-1, eine Komponente des SWI/SNF-Komplexes, rekrutiert. Daneben gibt es noch viele weitere Bindungspartner des  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-Komplexes, die die Transkription Wnt-responsiver Gene aktivieren oder regulieren (siehe Gordon *et al.* und He *et al.* (Gordon and Nusse, 2006; He and Axelrod, 2006)) (Abbildung 5B).



**Abbildung 5: Der kanonische Wnt-Signalweg.**

**(A) unstimuliert:**  $\beta$ -Catenin wird durch einen Proteinkomplex bestehend aus Axin, APC, GSK3- $\beta$  und CK-1 phosphoryliert, durch  $\beta$ -TrCP polyubiquitinyliert und anschließend proteasomal abgebaut. Tcf/Lef bindet im Komplex mit den Repressoren Groucho, HDAC und CtBP an  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsive DNA-Elemente. Wnt-Zielgene werden nicht transkribiert. **(B) stimuliert:** Wnt-Liganden binden an den Fz-LRP5/6-Rezeptorkomplex. LRP5/6 wird durch GSK3- $\beta$  und CK-1 phosphoryliert und Axin wird, vermutlich durch Dvl unterstützt, rekrutiert. Hypophosphoryliertes  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytoplasma und wird in den Zellkern transportiert. Dort verdrängt es Groucho und bindet Tcf/Lef sowie Transkriptionskofaktoren, u.a. BCL-9 (im Komplex mit Pygo), CBP/p300 und Brg-1. Die Transkription von Wnt-Zielgenen wird eingeleitet.



Mutationsanalysen haben gezeigt, dass die Wnt-Signaltransduktion in viele biologische Prozesse involviert ist und die Regulation Wnt-responsiver Gene meist vom Zelltyp abhängt. In der Zukunft gilt es zu untersuchen, wie unterschiedlich verschiedene Zelltypen aufgrund differentieller Genexpression auf Wnt-Signale antworten (Logan and Nusse, 2004). Ein besonderes Merkmal des Wnt-Signalweges ist dessen Selbstkontrolle durch Rückkopplungsmechanismen (Feedback-Kontrolle). Wnt-Signalmoleküle regulieren die Genexpression von Komponenten des Wnt-Signalweges, wie z.B. *Fz* (Muller et al., 1999), *LRP* (Wehrli et al., 2000), *Axin-2* (Jho et al., 2002),  *$\beta$ -TrCP* (Spiegelman et al., 2000), *( $\Delta$ N)Tcf-1* (Roose and Clevers, 1999), *Lef-1* (Hovanes et al., 2001). Eine weitere Gruppe Wnt-responsiver Gene sind Zellzyklusregulatoren, wie z.B. *c-myc* und *Cyclin D1* (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999). D.h., Wnt-Signaltransduktion aktiviert die Zellproliferation. *Wnt*<sup>-/-</sup>-Phänotypen können meist durch fehlende Zellproliferation erklärt werden. Neuere Studien lassen auch eine Regulation der Zelladhäsion durch Wnt vermuten, dies muss allerdings noch bestätigt werden (Jamora et al., 2003).

#### 2.4.2.1 $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin ist ein multifunktionales Adapterprotein. An der Plasmamembran interagiert es mit der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin und vermittelt die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsion (Meigs et al., 2001). Als Effektor des kanonischen Wnt-Signalweges wird die Stabilität und Aktivität von  $\beta$ -Catenin durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert. Möglicherweise regulieren auch andere Signalwege  $\beta$ -Catenin über diesen Mechanismus (Fujino and Regan, 2001). Es wird vermutet, dass unterschiedliche molekulare Formen des Proteins für dessen Interaktion mit E-Cadherin bzw. Tcf/Lef ausschlaggebend sind und dass die Funktion von  $\beta$ -Catenin über dessen molekulare Form reguliert wird (Gottardi and Gumbiner, 2004). Die Regulation der N-terminalen Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin bestimmt dessen Stabilität (Dajani et al., 2001; Harwood, 2001). Die zentralen Armadillo-Sequenzwiederholungen (siehe *Drosophila*-Homolog Armadillo (Arm)) vermitteln die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit  $\alpha$ -Catenin, E-Cadherin, Axin, APC und Tcf/Lef (Aberle et al., 1994; Behrens et al., 1998; Behrens et al., 1996; Huelsken et al., 1994; Rubinfeld et al., 1995; von Kries et al., 2000; Xing et al., 2003). Über den C-Terminus bindet es Transkriptionskofaktoren (Barker and Clevers, 2000). Im Zellkern bildet  $\beta$ -Catenin zusammen mit Tcf/Lef einen Transkriptionskomplex. Dabei aktiviert es vorzugsweise Lef-1 (Simcha et al., 1998). Über die zusätzliche Bindung von Transkriptionskofaktoren entsteht ein aktiver Transkriptionskomplex. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin ist nicht transkriptionell aktiv (Sadot et al., 2002). Wie  $\beta$ -Catenin in den Zellkern transportiert wird, ist mechanistisch noch nicht

aufgeklärt. Es besitzt kein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). Trotzdem wird es ständig in den Zellkern importiert bzw. aus dem Zellkern exportiert (Yokoya et al., 1999).

#### 2.4.2.2 Tcf/Lef-Faktoren

Die Tcf/Lef-Faktoren bilden das unterste Glied des kanonischen Wnt-Signalweges. Tcf-1, Lef-1, Tcf-3 und Tcf-4 besitzen eine DBD, die Homologien zu der Familie der HMG-Box-Transkriptionsfaktoren (High Mobility Group) aufweist. Über diese Domäne binden Tcf/Lef-Faktoren an die Konsensussequenz 5' AGATCAAAGGG 3' Wnt-responsiver Zielgene und üben damit eine architektonische Funktion aus (Giese et al., 1991; van Beest et al., 2000; van de Wetering et al., 1991). Der innerhalb der Tcf/Lef-Familie konservierte N-Terminus der Proteine vermittelt die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin (Graham et al., 2000). In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin befindet sich Tcf/Lef in einem Repressorkomplex. Gelangt  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, werden die Repressoren verdrängt, Tcf/Lef wird sumoyliert (Ihara et al., 2005; Yamamoto et al., 2003) und ein aktiver Transkriptionskomplex wird durch die  $\beta$ -Catenin-abhängige Rekrutierung von Transkriptionskofaktoren gebildet. Wnt-responsive Gene werden transkribiert. Obwohl die Promotoren  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsiver Gene mehrere Tcf/Lef-Konsensussequenzen enthalten, sind  $\beta$ -Catenin und Tcf/Lef nicht ausreichend, deren Transkription zu aktivieren (Prieve and Waterman, 1999). Eine Ausnahme bildet lediglich Lef-1, das eine kontextabhängige Aktivierungsdomäne besitzt und in Anwesenheit des Koaktivators ALY die Transkription aktivieren kann (Bruhn et al., 1997). Tcf/Lef-Faktoren besitzen ein NLS, allerdings unterscheidet sich die intrazelluläre Lokalisation der einzelnen Familienmitglieder (Prieve et al., 1998). Die Genexpression von *Tcf/Lef* wird u.a. durch den Wnt-Signalweg (Hovanes et al., 2001; Roose and Clevers, 1999) und p53 (Rother et al., 2004) reguliert. Die Rolle extensiven alternativen Spleißens der *Tcf/Lef* mRNA ist bisher nicht aufgeklärt (Duval et al., 2000; Korinek et al., 1997; Van de Wetering et al., 1996; Waterman et al., 1991). *Tcf-1* und *Lef-1* enthalten einen alternativen Promotor, der zur Expression N-terminal trunkierter Proteine führt, denen die  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne fehlt (Hovanes et al., 2001; Van de Wetering et al., 1996).

### 2.5 Die Rolle der Wnt-Signaltransduktion bei der Entstehung von Krankheiten

Die deregulierte Wnt-Signaltransduktion ist die Ursache vieler Erkrankungen. So verursacht eine Mutation im *Wnt-3*-Gen, die zu einem Funktionsverlust von Wnt-3 führt, die seltene genetische Erkrankung Tetraamelie (Niemann et al., 2004). Mutationen im *LRP-5*-Gen beeinträchtigen die Knochendichte. Während eine aktivierende *LRP-5*-Mutation zu erhöhter Knochendichte führt (Boyden et al., 2002), verursacht eine Mutation, die zu einem

Funktionsverlust führt, Osteoporose (Gong et al., 2001). Agenesie der Zähne und eine Prädisposition zur Entstehung kolorektaler Tumoren wird durch eine Missense-Mutation des *Axin-2*-Gens verursacht (Lammi et al., 2004). Weitere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Chorea Huntington, mit verminderter Wnt-Signaltransduktion einhergehen (Caricasole et al., 2004; Carmichael et al., 2002).

<b><math>\beta</math>-Catenin-Tcf/Lef-responsives Gen</b>	<b>Funktion</b>
<i>c-Myc</i> , <i>Cyclin-D1</i> (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999)	Zellzyklusregulatoren, erhöhte Zellproliferation
<i>Survivin</i> (Kim et al., 2003; Zhang et al., 2001a)	Apoptoseinhibitor, Akkumulation transformierter Zellen
<i>FGF18</i> (Shimokawa et al., 2003)	Wachstumsfaktor, erhöhte Zellproliferation
<i>c-Met</i> (Boon et al., 2002)	Tyrosinkinase, erhöhte Zellproliferation und Tumorzellinvasion
<i>VEGF</i> (Zhang et al., 2001b)	Wachstumsfaktor, Angiogenese
<i>MMP7</i> , <i>MMP26</i> (Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999; Marchenko et al., 2002)	Metalloproteinasen, Abbau der extrazellulären Matrix, Tumorzellprogression
<i>CD44</i> (Wielenga et al., 1999)	Metastasierung
<i>Nr-Cam</i> (Conacci-Sorrell et al., 2002)	Adhäsionsrezeptor, Transformation von Fibroblasten, erhöht ihre Motilität

**Tabelle 2:  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsive Gene und ihre Funktion während der Onkogenese.**

Mutationen, die den kanonischen Wnt-Signalweg konstitutiv aktivieren, d.h.  $\beta$ -Catenin stabilisieren, führen zur Onkogenese. Viele Tumoren weisen eine Mutation des  *$\beta$ -Catenin*-Gens bzw. eine Mutation des *APC*-, *Axin*-, oder *Axin-2*-Gens auf. Ein weiterer Mechanismus der Aktivierung des Wnt-Signalweges ist die Hypermethylierung der DNA, wie es für das *wt APC*-Gen beschrieben wurde. Diese Veränderungen induzieren die Tumorentstehung in der Haut, im Gehirn, in der Schilddrüse, im Rückenmark, in der Leber, im Magen, in der Niere, in den Eierstöcken, in der Gebärmutter, in der Prostata, im Dickdarm und im Mastdarm (siehe Review (Behrens and Lustig, 2004)). Der initiale Schritt der Onkogenese ist das Entkoppeln von  $\beta$ -Catenin. Die Aktivierung der CRT führt neben der initialen Zellexpansion zur Tumorzellprogression, einer erhöhten Zellmotilität und damit zu einer erhöhten Metastasierungskapazität der Tumorzellen. Die Ursache für diese weitgreifenden

---

Veränderungen der Zellen ist die Vielzahl unterschiedlicher Wnt-responsiver Gene, die anhand von Genexpressionsstudien in zellulären Systemen und Tumoren ermittelt wurden. Eine kleine Auswahl  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsiver Gene und ihrer Funktion ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

## 2.6 Fragestellung

Das *p53*-homologe *p63*-Gen kodiert für Proteine mit unterschiedlichen Funktionen. Aufgrund eines kryptischen Promotors und extensiven alternativen Spleißens werden mehrere Isoformen der DNA-bindenden Proteine exprimiert, die transaktivierende und reprimierende Eigenschaften besitzen. Während die *p63*-Proteine, besonders  $\Delta Np63\alpha$ , für die Entwicklung epithelialer Gewebe essentiell sind, ist ihre Bedeutung bei der Onkogenese umstritten (Mills, 2006; Yang and McKeon, 2000). Wir haben uns die Frage gestellt, ob  $\Delta Np63\alpha$ , ein Antagonist des Tumorsuppressors *p53*, unabhängig von *p53* Gene reguliert, die einen onkogenen Phänotyp induzieren. Patturajan *et al.* konnten zeigen, dass  $\Delta Np63\alpha$  die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und die  $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription (CRT) Wnt-responsiver Gene aktiviert (Patturajan *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von  $\Delta Np63\alpha$  bei der CRT charakterisiert werden. Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

Aktiviert  $\Delta Np63\alpha$  spezifisch die CRT, d.h. den kanonischen Wnt-Signalweg, oder aktiviert es auch andere wachstumsregulatorische Signalwege? Wie beeinflussen die *p63*-Homologen *p53* und *p73* die CRT? Welche Proteindomänen von  $\Delta Np63\alpha$  sind notwendig bzw. hinreichend für die Aktivierung der CRT? Dabei sollten verschiedene *p63*-Isoformen, die Koexpression eines Inhibitors der Oligomerisierung sowie physiologisch relevante Punktmutanten aus humanen *p63*-Syndromen auf die Aktivierung der CRT untersucht werden.

Wo greift  $\Delta Np63\alpha$  in den kanonischen Wnt-Signalweg ein und welcher Mechanismus liegt der Aktivierung der CRT zugrunde? Inhibiert  $\Delta Np63\alpha$  den  $\beta$ -Catenin-abbauenden Proteinkomplex bestehend aus Axin, APC, GSK3- $\beta$  und CK-1? Welchen Einfluss hat es auf die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin? Ist  $\Delta Np63\alpha$  Teil des aktiven  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-Transkriptionskomplexes?

Diese Untersuchungen sollten Teilantworten auf die umfassendere Frage geben:

Könnte  $\Delta Np63\alpha$  über die Regulation der CRT unabhängig von *p53* die Onkogenese durch Deregulation des kanonischen Wnt-Signalweges induzieren und damit als Onkogen fungieren?

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

BioRad GenePulser® II electroporator	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bioruptor™	Diagenode sa, Liège (Belgien)
Brutschrank Heraeus „HERAcell®“	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
EC 250-90 Power Supply	E-C Apparatus Corp., St. Petersburg (USA)
Entwickler-Maschine „Gevamatic 60“	Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG, Köln
Eppendorf® Research Series 2100 Pipetten (0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage Expert LE623S	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Folien-Schweißgerät „VACUPACK 2 PLUS“	Krupps GmbH, Solingen
Gefrierschrank –20° C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Gefrierschrank –80° C	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GeneQuant™ <i>pro</i> RNA/DNA Calculator	GE Healthcare Europe GmbH, München
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Hettich MIKRO 22R Mikrozentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Horizontale Elektrophoresekammer, (Gelschlitten und Kämme für Agarosegele)	Harnischmacher Labortechnik, Kassel
Keutz® Minigelkammer	von Keutz, Reiskirchen
Kippschüttler	von Keutz, Reiskirchen
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Microplate Luminometer CENTRO LB 960	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikrowellengerät	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe

---

PCR Cycler Primus 25 advanced	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter CG 832	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz
pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Quarzküvette	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Schüttler für Bakterienkultur	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Sterilbank Heraeus „HERAsafe®“	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Überkopftrotierer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortex Reagenzglasrührer	neoLab®, Heidelberg
Wasserbad TW20	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Westernblotkammer „Mini Trans-Blot Cell“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zählkammer Neubauer improved	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

6 Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
12 Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Amersham Hyperfilm™ ECL™	GE Deutschland, München
Cryoröhrchen CryoLine™ (1,8 ml)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Filter Top Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filter Top Zellkulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gene Pulser Cuvettes, 0,1 cm gap	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Insulinspritze	Buettner-Frank GmbH, Erlangen
Lab-Tek™ Chamber Slides™ (4 Well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
LumiNunc™ 96 MicroWell™ Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Petrischalen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

---

Protran® Nitrocellulose-Membran	Whatman GmbH, Dassel
Röhrchen mit Schraubverschluss 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen mit Schraubverschluss 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatman 3MM Chr Blotting Sheets	Whatman GmbH, Dassel
Zellschaber (1,3 cm Klinge)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

### 3.3 Chemikalien

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose, ultrarein	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin (Natriumsalz)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bacto-Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
complete® mini EDTA-free (Proteaseinhibitoren)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Desoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Essigsäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol (abs.)	Riedel-de-Haën, Seelze
Fluoprep	bioMérieux, Marcy l'Etoile (Frankreich)
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe



---

Glycin	Riedel-de-Haën, Seelze
Glykogen	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Jodacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Methanol	Riedel-de-Haën, Seelze
N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Naturaflor® Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Nonidet® P40 (NP40)	GE Deutschland, München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein A-Sepharose® von <i>Staphylococcus aureus</i> (PAS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Stickstoff (99,996%)	Messer Group GmbH, Sulzheim
Tetracyclin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trasylol 200.000 KIE	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

---

Trypton	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wasser, nukleasefrei	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 3.4 Kits und Reagenzien

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
QIAquick™ PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam (Niederlande)
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

### 3.5 Antikörper

#### 3.5.1 Primärantikörper

$\alpha$ - $\beta$ -Actin (AC-15), Maus monoklonal	Abcam plc, Cambridge (Großbritannien)
$\alpha$ - $\beta$ -catenin (E-5), Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
$\alpha$ - $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal), Maus monoklonal	Promega GmbH, Mannheim
$\alpha$ -GFP, Maus monoklonal	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
$\alpha$ -HA.11, Maus monoklonal	Covance Research Products, Inc., Berkeley (USA)
$\alpha$ -Myc Tag (clone 4A6), Maus monoklonal	Biomol GmbH, Hamburg
$\alpha$ -p53 (Ab-2, PAb1801), Maus monoklonal	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts.
$\alpha$ -p63 (4A4), Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

---

$\alpha$ -p73 (Ab-2, ER-15), Maus monoklonal	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts.
$\alpha$ -Phospho- $\beta$ -Catenin (Ser33/37/Thr41), Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
$\alpha$ -Tcf-4 (clone 6H5-3), Maus monoklonal	Biomol GmbH, Hamburg

### 3.5.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor® 594 (Rot) Ziege anti-Maus IgG <sub>1</sub>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ziege $\alpha$ -Kaninchen IgG, F(ab') <sub>2</sub> -Fragment, POD-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege $\alpha$ -Maus IgG, F(ab') <sub>2</sub> -Fragment, POD-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg

## 3.6 Vektoren und Plasmide

### 3.6.1 Vektoren und Expressionsplasmide

pcDNA3	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$ ( <i>mus musculus</i> )	Frank McKeon, Boston (USA)
pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\beta$ ( <i>mus musculus</i> )	s. Kapitel 4.2.7.2.1
pcDNA3- $\Delta$ Np73 $\alpha$ ( <i>homo sapiens</i> )	Natalia Kartasheva, Marburg
pcDNA3-Gli-1 ( <i>mus musculus</i> ) (Sasaki et al., 1999)	Hiroshi Sasaki, Kobe (Japan)
pcDNA3-myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$	Hans van Bokhoven, Nijmegen (Niederlande)
pcDNA3-myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$ C306R ( <i>mus musculus</i> ) (Celli et al., 1999)	Hans van Bokhoven, Nijmegen (Niederlande)
pcDNA3-myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$ L518F ( <i>mus musculus</i> ) (McGrath et al., 2001)	Hans van Bokhoven, Nijmegen (Niederlande)
pcDNA3-myc- $\Delta$ NTcf-4 ( <i>homo sapiens</i> )	Bert Vogelstein, Baltimore (USA)
pcDNA3-myc-Tcf-4 ( <i>homo sapiens</i> )	Bert Vogelstein, Baltimore (USA)
pcDNA3-p63DD-CHA ( <i>mus musculus</i> )	Angelika Waltermann, Marburg
pcDNA3-p63DDmut-CHA ( <i>mus musculus</i> )	Angelika Waltermann, Marburg
pcDNA3-TA*p63 $\alpha$ ( <i>mus musculus</i> )	Frank McKeon, Boston (USA)

pcDNA3-TAp63 $\alpha$ ( <i>mus musculus</i> )	Frank McKeon, Boston (USA)
pCIneo- $\beta$ -Catenin ( <i>homo sapiens</i> )	Bert Vogelstein, Baltimore (USA)
pCIneo- $\beta$ -Catenin S33Y ( <i>homo sapiens</i> ) (Morin et al., 1997)	Bert Vogelstein, Baltimore (USA)
pCMV-eGFP	Claudia Lenz-Bauer, Marburg
pRC-CMV-p51A ( <i>homo sapiens</i> TAp63 $\gamma$ )	Shuntaro Ikawa, Sendai (Japan)
pRC-CMV-p53 ( <i>homo sapiens</i> ) (Lin et al., 1994)	Arnold J. Levine, Princeton (USA)

### 3.6.2 Reporterplasmide

8x3'Gli-BS $\delta$ 51LucII (Kamachi and Kondoh, 1993; Sasaki et al., 1997)	Hiroshi Sasaki, Kobe (Japan)
pGL3-OF (abgeleitet von pFOPFLASH) (He et al., 1998; Korinek et al., 1997)	Bert Vogelstein, Baltimore (USA)
pGL3-OT (abgeleitet von pTOPFLASH) (He et al., 1998; Korinek et al., 1997)	Bert Vogelstein, Baltimore (USA)
pGL3-Promoter	Promega GmbH, Mannheim
pRL- <i>tk</i>	Promega GmbH, Mannheim

### 3.7 Oligonukleotide

$\Delta$ Np63 $\beta$ hin	5' ACT GCA GCA TTG TCA GGA TTT GGC AAG TCT GA 3'
$\Delta$ Np63 $\beta$ rück	5' TCA GAC TTG CCA AAT CCT GAC AAT GCT GCA GT 3'

Die Oligonukleotide wurden von der MWG-Biotech AG in Ebersberg synthetisiert.

### 3.8 Bakterienzellen

ElectroMAX <sup>TM</sup> DH10B <sup>TM</sup> Cells	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
--	----------------------------

*E. coli*, Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU* *galK*  $\lambda$ - *rpsL* *nupG*

### 3.9 Eukaryotische Zelllinien

NCI-H1299	humanes Großzellen Lungenkarzinom, ATCC® Nr.: CRL-5803™
HEK-293	humane embryonale Nierenzellen, ATCC® Nr.: CRL-1573™

### 3.10 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

2YT-Medium	10 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	16 g	Trypton
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
Ampicillin-Stammlösung	20 mg/ml	Ampicillin in dH <sub>2</sub> O
LB-Agar	7,5 g	Bacto-Agar
	ad 500 ml	LB-Medium
LB-Medium	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	10 g	Trypton
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O

### 3.11 Medien und Lösungen für die Kultur eukaryotischer Zellen

200 mM L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ciprobay® (2 mg/ml Ciprofloxacin)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
D-MEM Vollmedium	s. Kapitel 4.1.2.1
Dulbecco's modified Eagle medium mit 25 mM HEPES-Puffer (D-MEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS <sup>++</sup>	s. Kapitel 3.12
PBS <sub>def.</sub>	s. Kapitel 3.12
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
5000 units/ml Penicillin : 5000µg/ml Streptomycin	

---

Tetracyclin-Stammlösung	5 mg/ml Tetracyclin in dH <sub>2</sub> O
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 3.12 Puffer und Lösungen

3 M Natriumacetat pH 5,2

6x DNA-Probenpuffer	40 % (w/v)	Saccharose
	10 % (v/v)	Glycerol
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau

6x Laemmli-Puffer	0,35 M	Tris-HCl pH 6,8
	30 % (v/v)	Glycerol
	10 % (w/v)	SDS
	9,3 % (w/v)	DTT
	0,012 % (w/v)	Bromphenolblau

10x Western Salts	250 mM	Tris-HCl pH 8,3
	1,9 M	Glycin
	0,02 % (w/v)	SDS
	ad 2 l	dH <sub>2</sub> O

50x Tris-Acetate (TAE)	2 M	Tris-Base
	0,1 M	EDTA
	1M	Essigsäure

70 % (v/v) Ethanol

Blockinglösung für Immunfluoreszenz	10 % (v/v)	FCS ind PBS <sup>++</sup>
-------------------------------------	------------	---------------------------

Blockinglösung für Western Blot	5 % (v/v)	Magermilchpulver in PBS-T
---------------------------------	-----------	---------------------------

Elutionspuffer (EB)	10 mM	Tris-HCl pH 8,5
---------------------	-------	-----------------

Material		
Co-IP-Lysis-Puffer	7 ml	Co-IP-Puffer
	1 Tablette	„complete® mini EDTA-free“
Co-IP-Puffer	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,5 % (v/v)	NP40
Phosphat gepufferte Salzlösung	137 mM	NaCl
für die Zellkultur (PBS <sup>++</sup> ) pH 7,4	2,5 mM	KCl
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,47 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,9 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
Phosphat gepufferte Salzlösung	137 mM	NaCl
(PBS <sub>def.</sub> ) pH 7,4	2,5 mM	KCl
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,47 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-T	0,1 % (v/v)	Tween 20 in PBS <sub>def.</sub>
RIPA-Puffer	20 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
	150 mM	NaCl
	1 % (w/v)	DOC (w/v)
	0,1% (w/v)	SDS (w/v)
	1 % (v/v)	Triton-X 100 (v/v)
	10 mM	Jodacetamid
	1 mM	PMSF
	5% (v/v)	Trasylol (entspricht 100.000 KIE)
Sammelgelpuffer	1 M	Tris-HCl pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS

Material		
SDS-Laufpuffer für Proteingele	25 mM	Tris-Base
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
	2 %	SDS
	100 mM	β-Mercaptoethanol
Transferpuffer	100 ml	10x Western Salts
	150 ml	Methanol
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
	0,4 % (w/v)	SDS
Tris gepufferte Salzlösung (TBS)	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
	150 mM	NaCl



## 4 Methoden

### 4.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1 Arbeiten mit Bakterien

Bakterien wie der *E.coli* Stamm DH10B™ dienen zur Vermehrung von Plasmiden für molekularbiologische Arbeiten.

##### 4.1.1.1 Transformation durch Elektroporation

Rekombinante Plasmide werden *in vivo* durch Replikation und Teilung transformierter Bakterienzellen vermehrt. Um DNA in Bakterienzellen einzuführen, werden die Bakterien einer speziellen Behandlung unterzogen, d.h., kompetent gemacht. Die Zellwand kompetenter Bakterien ist für DNA durchlässig.

Die kommerziell erhältlichen *E. coli* Zellen ElectroMAX™ DH10B™ werden durch Elektroporation laut Herstellerprotokoll mit einem Expressionsplasmid transformiert, das ein Antibiotikaresistenzgen als Marker enthält. Im Anschluss werden die Zellen auf einer vorgewärmten antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

##### 4.1.1.2 Bakterienkultur

Zur Vermehrung von transformierten Bakterienzellen werden 3ml bzw. 30ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium mit einer transformierten Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

##### 4.1.1.3 Glycerolkultur

Von einer frischen 30ml Bakterienkultur werden 800µl entnommen und mit 200µl 80% Glycerol in 2YT gut vermischt. Anschließend werden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so konservierten Kulturen können bei –80°C über einen langen Zeitraum gelagert werden.

#### 4.1.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung und Transfektion von eukaryotischen Zellkulturen erfolgt unter sterilen Bedingungen.

##### 4.1.2.1 Kultivierung von HEK-293- und NCI-H1299-Zellen

Zur Kultivierung von adhärenenten Zelllinien werden ventilierte Kulturflaschen verwendet, die bei einer konstanten Temperatur von 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-

Gehalt von 5% inkubiert werden. Das verwendete Nährmedium setzt sich wie folgt zusammen:

500 ml	D-MEM
50 ml	FCS
5 ml	L-Glutamin-Lösung
5 ml	Penicillin-Streptomycin Lösung
3 ml	Ciprobay®
200 µl	Tetracyclin-Stammlösung.

Zur Passage der Zelllinien wird das Nährmedium entfernt und die Zellen werden zweimal mit 10ml PBS<sub>def.</sub> gewaschen, um tote Zellen und zweiwertige Kationen zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen erfolgt eine Inkubation mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung pro 50cm<sup>2</sup> Zellrasen. Dabei bindet der Chelatbildner EDTA die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Die Protease Trypsin sorgt durch die Spaltung der Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und zum Gefäßboden für das Herauslösen der Zellen aus ihrem Verband. Durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche lösen sich die Zellen vom Boden ab und werden in 10ml frischem Vollmedium resuspendiert. Überschüssiges Trypsin wird durch die im FCS enthaltenen Protease-Inhibitoren inaktiviert. Für die kontinuierliche Kultur werden die Zellen abhängig von der Zelllinie und der Zelldichte umgesetzt. HEK-293- und NCI-H1299-Zellen werden 1:8 bzw. 1:10 passagiert. D.h., 1/8 bzw. 1/10 der Zellsuspension wird in eine neue Zellkulturflasche mit Vollmedium überführt. Für Transfektionsexperimente wird eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät. Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wird ein Tropfen einer frischen Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben und vier Großquadrate ausgezählt. Der Mittelwert der Zellzahl eines Großquadrates wird mit dem Kammerfaktor der Zählkammer,  $1,0 \times 10^4$  Zellen/ml, multipliziert. Daraus ergibt sich die Anzahl der Zellen pro ml Suspension.

#### 4.1.2.2 Einfrieren von Zellen

Von den verwendeten Zelllinien werden von einer frühen Passage mehrere Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu werden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung aus ihrem Verband gelöst und in Vollmedium resuspendiert. Im Anschluss werden die Zellen bei 800UpM (Umdrehungen pro Minute) und 4°C für 5min zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Das Zellpellet wird in einer auf Eis vorgekühlten Lösung aus 10% DMSO und 90% FCS resuspendiert und in Kryoröhrchen verteilt. Diese werden zunächst in Papiertücher gewickelt und über Nacht bei -80 °C langsam abgekühlt, bevor der Transfer in flüssigen Stickstoff erfolgt.

Für das Auftauen der Zellen wird Vollmedium in einer Zellkulturflasche vorgewärmt. Nach Entnahme der tiefgefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff werden diese bei 37°C kurz

angetaut und sofort in die Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wird das Kulturmedium gewechselt, um das DMSO zu entfernen. Nach einigen Passagen können die Zellen für Transfektionsexperimente verwendet werden.

#### 4.1.2.3 Liposomen-vermittelte Transfektion mittels Lipofectamine™2000

Mittels Lipofectamine™2000 wird die Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zellen über Liposomen-vermittelte Transfektion erreicht (Felgner et al., 1987; Felgner and Ringold, 1989). Hierbei erfolgt die Aufnahme der DNA in Form von Komplexen mit artifiziellen Liposomen, die eine Verschmelzung mit der Plasmamembran vermitteln. Das optimale Verhältnis zwischen DNA und den verwendeten Lipiden muß dabei experimentell ermittelt werden.

12-24h vor der Transfektion wird eine entsprechende Anzahl von Zellen in Vollmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Transfektion wird die Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit D-MEM versetzt (Ansatz A). In einem weiteren Gefäß wird D-MEM mit Lipofectamine™2000 versetzt, gemischt und 5min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (Ansatz B). Ansatz B kann als Stammlösung für mehrere Transfektionen angesetzt werden. Daraufhin werden beide Ansätze vereinigt, gemischt und 20min bei RT inkubiert. Die Transfektionsansätze werden danach direkt in das vorhandene Kulturmedium gegeben und die Zellen werden weitere 24h im Brutschrank inkubiert. Nach 3-6h kann ein Mediumwechsel mit frischem Vollmedium vorgenommen werden.

4 Well Objektträger		12 Well Zellkulturplatte	75cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche
HEK-293		75.000 Zellen/Well	
NCI-H1299	50.000 Zellen/Well	100.000 Zellen/Well	1,6 x 10 <sup>6</sup> Zellen
Ansatz A	568ng DNA	1,2µg DNA	19,2µg DNA
Ansatz B	47µl D-MEM	100µl D-MEM	800µl D-MEM
	1,9µl Lipofectamine™2000	4µl Lipofectamine™2000	64µl Lipofectamine™2000

## **4.2 Molekularbiologische Methoden**

### **4.2.1 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab**

Die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab bietet sich an, um z.B. nach einer ortsgerichteten Mutagenese (4.2.7.2) die rekombinanten Plasmide zu amplifizieren und zu analysieren.

Eine einzelne Bakterienkolonie wird in 3ml antibiotikumhaltigem 2YT-Medium resuspendiert und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 1,5ml der Übernachtskultur (ÜNK) werden zur DNA-Präparation eingesetzt. Der Rest wird bei 4°C aufbewahrt. Die Präparation erfolgt mit Hilfe des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I. Die DNA wird laut Herstellerprotokoll isoliert und in 50µl EB eluiert.

### **4.2.2 Plasmidpräparation im mittleren und großen Maßstab**

Größere Mengen an Plasmid-DNA werden mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II laut Herstellerprotokoll isoliert. Dazu werden 30ml bzw. 100ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium mit 30µl bzw. 100µl einer frischen ÜNK inokuliert und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Präparation wird die DNA in 300-600µl EB eluiert.

### **4.2.3 Reinigung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren, die in molekularbiologische Experimente eingesetzt werden, dürfen keine Verunreinigungen enthalten. Phenol, Chloroform, Alkohol, EDTA, Detergenzien, Salze oder Proteine greifen negativ in den Verlauf biochemischer Reaktionen ein.

#### **4.2.3.1 QIAquick™ PCR Purification Kit**

Mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purification Kit wird DNA über eine Säulenmatrix von Proteinen und Salzen befreit. Diese Art der Reinigung empfiehlt sich nach der Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um die Enzyme aus der Lösung zu entfernen. Die Durchführung erfolgt laut Herstellerprotokoll. Die gereinigte DNA wird in 50µl EB von der Säulenmatrix eluiert.

#### **4.2.3.2 Ethanolfällung**

Mittels Ethanolfällung wird die DNA gereinigt und ankonzentriert. In Gegenwart von monovalenten Kationen bildet die DNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert werden kann. Dazu wird die DNA-Lösung (1 Volumenteil (VT)) mit  $\frac{1}{10}$ VT 3M Natriumacetatlösung, pH 5,2, und  $2\frac{1}{2}$  VT Ethanol abs. versetzt und gevortext. Danach wird die DNA bei RT und 14.000UpM 30min zentrifugiert und dadurch pelletiert. Die mit der DNA präzipitierten Salze lösen sich im anschließenden Waschschrift in 250µl

70%igem Ethanol. Danach wird die DNA bei RT und 14.000UpM 5min zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in EB eluiert. Geringe Mengen an DNA können mit Hilfe eines in Ethanol präzipitierbaren Trägermoleküls, z.B. Glykogen, mitgefällt werden. Dazu wird die DNA-Lösung vor der Präzipitation mit 1µg Glykogen versetzt und gevortext. Bei der Verwendung von Trägermolekülen sollte darauf geachtet werden, dass sie mit den nachfolgenden Experimenten nicht interferieren.

#### 4.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf deren Absorptionsmaximum bei 260nm. Zur Quantifizierung von DNA- und RNA-Lösungen wird deren Optische Dichte bei 260nm ( $OD_{260}$ ) in einer Quarzküvette mit 1cm Lichtweg bestimmt. Bei dieser Wellenlänge ist der Nukleinsäuregehalt direkt proportional zur gemessenen Optischen Dichte. Damit der Absorptionswert im linearen Bereich zwischen 0,01 und 0,8 liegt, wird die Probe 1:100 in dH<sub>2</sub>O verdünnt. Für eine  $OD_{260} = 1$  gelten folgende Faktoren: doppelsträngige (ds) DNA 50µg/ml, einzelsträngige (ss) DNA 40µg/ml, ssRNA 33µg/ml (Maniatis et al., 1989). Die Nukleinsäurekonzentration wird mit folgender Formel ermittelt:

$$OD_{260} \times \text{Faktor (dsDNA/ssDNA/ssRNA)}$$

$$\text{Nukleinsäurekonzentration} = \frac{\text{Nukleinsäurekonzentration}}{\text{Verdünnung der DNA-Lösung (1:100 = 0,01)}}$$

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280nm. Das Verhältnis  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  erlaubt dementsprechend eine Aussage über die Qualität der Nukleinsäurepräparation. Bei einer reinen DNA-Lösung ist der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  1,8, bei einer reinen RNA-Lösung 2,0. Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol ergeben deutlich geringere Quotienten.

#### 4.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren werden je nach Fragestellung unter nativen oder denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix, Polyacrylamidgelmatrix oder Formaldehydgelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. Präparative Gele dienen der Reinigung, analytische der Größenbestimmung von Nukleinsäuren, z.B. nach enzymatischen Reaktionen.

##### 4.2.5.1 Agarosegelelektrophorese

In Agarosegelen lassen sich DNA-Fragmente je nach Konzentration der Agarose über einen sehr weiten Größenbereich auftrennen. Entsprechend der zu analysierenden DNA-Fragmente wird ein 0,3%iges bis 2%iges Agarosegel für DNA-Fragmente von 5-60kb bis 0,1-2kb verwendet. Neben der absoluten Masse der Nukleinsäuremoleküle hängt ihre

Wanderungsgeschwindigkeit im nativen Agarosegel auch von ihrer Form ab. Die Agarose wird in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt ist, wird Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,1-0,5µg/ml untergemischt. Aufgrund seiner planaren Struktur kann Ethidiumbromid in die DNA interkalieren. Es interagiert deutlich schwächer mit ssDNA und RNA. Ein Gelschlitten wird mit einem Kamm bestückt und mit der Gelmatrix ausgegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm gezogen. Die DNA wird mit  $\frac{1}{6}$  6x DNA-Probenpuffer versetzt. Dadurch wird die Dichte der DNA-Lösung erhöht, so dass sie in die Taschen sinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert. Außerdem ist in dem DNA-Probenpuffer ein Farbstoff enthalten, der einen Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA im Gel bietet. Bromphenolblau wandert entsprechend einem 300bp DNA-Fragment. Die Elektrophorese wird bei 100V durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass Ethidiumbromid aufgrund seiner positiven Ladung entgegen der negativ geladenen DNA läuft. Die DNA wird anhand der Fluoreszenz des interkalierten Farbstoffs nachgewiesen. Dieser wird bei 254-366nm angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm).

#### **4.2.6 Sequenzanalyse**

Die Sequenzanalyse wurde in Form von *Hot Shot Sequencing* und *extended Hot Shot Sequencing* Analysen von der Firma SEQLAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH, durchgeführt.

#### **4.2.7 Modifizierung von Nukleinsäuren**

##### **4.2.7.1 Analytischer Restriktionsendonukleaseverdau**

In einem analytischen Restriktionsansatz wird die zu untersuchende DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen unter definierten Pufferbedingungen bei einer definierten Temperatur inkubiert. Dazu werden 0,5-1µg DNA und 5-10U eines Restriktionsenzym laut Herstellerprotokoll 1-2h inkubiert. Soll die DNA durch zwei Restriktionsenzyme geschnitten werden, so kann dies gleichzeitig geschehen, sofern die Enzyme die gleichen Reaktionsbedingungen benötigen. Besitzt eines der Enzyme ein anderes Temperaturoptimum, muss der Verdau nacheinander erfolgen. Entfalten die Enzyme ihre Aktivität unter unterschiedlichen Pufferbedingungen, muss die DNA nach dem ersten Verdau gereinigt (4.2.3.1) und umgepuffert werden, bevor sie mit dem zweiten Enzym verdaut werden kann. Anschließend wird die DNA über Agarosegelelektrophorese analysiert (4.2.5.1).

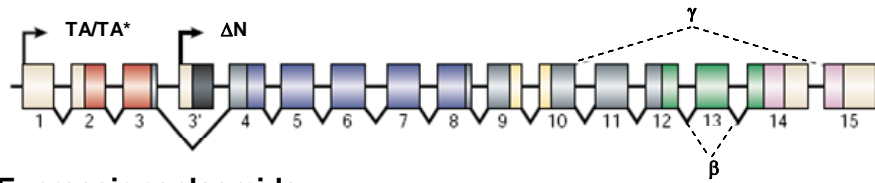
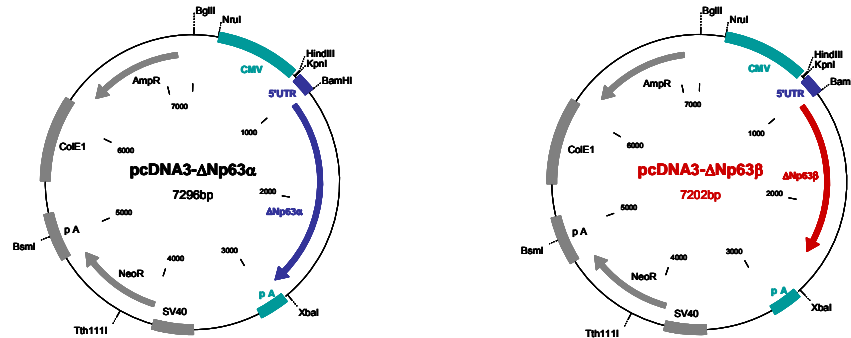
#### 4.2.7.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit ist es möglich, Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen effizient in Plasmid-DNA einzubringen. Die Grundlage dieser Methode ist eine PCR und die damit verbundene zyklische Neusynthese und exponentielle Amplifikation von DNA. Die PCR geht auf Arbeiten von Kary B. Mullis zurück, für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt.

Bei der ortsgerichteten Mutagenese wird ein superhelikales Plasmid, welches das zu verändernde Insert enthält, mit zwei zueinander komplementären Oligonukleotidprimern amplifiziert, die die gewünschte Mutation flankiert von je 15 Nukleotiden der Originalsequenz enthalten. Die für die Synthese eingesetzte *PfuTurbo*® DNA-Polymerase repliziert beide DNA-Stränge mit hoher Genauigkeit, ohne durch die mutierten Primer behindert zu werden. Dabei werden die Oligonukleotide inkorporiert und verlängert, ohne dass die DNA-Stränge verdrängt werden. So entstehen mutierte doppelsträngige Plasmide, die versetzt Einzelstrangbrüche tragen. Im Anschluss erfolgt ein *DpnI*-Verdau. *DpnI* erkennt und schneidet die durch die bakterielle *dam*-Methylase methylierten und hemimethylierten parentalen Plasmide (5'-G<sup>m6</sup>ATC-3'). Die synthetisch aus der PCR hervorgegangenen Plasmide werden dagegen nicht geschnitten und können in Bakterienzellen transformiert werden (4.1.1.1).

Reaktionsansatz:	50 ng	Plasmid-DNA
	125 ng	Hin-Primer
	125 ng	Rück-Primer
	je 10 nmol	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	5 µl	10x Reaction Buffer
	ad 49 µl	dH <sub>2</sub> O
	1 µl	<i>PfuTurbo</i> ® DNA-Polymerase [2,5 U]

PCR-Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95°C	30 s
Denaturierung	12-18	95°C	30 s
Annealing		55°C	1 min
Synthese		68°C	2 min/kb
Kühlung	1	8°C	∞

**A** *p63* Genstruktur:**B** Expressionsplasmide:**C**  $\Delta Np63\alpha$  ORF:

```

1  ATGttgtacc tggaaaacaa tgcccagact caatttagtg agccacagta cacgaacctg
61  gggctcctga acagcatgga ccagcagatt cagaacggct cctcgtccac cagcccctac
121 aacacagacc acgcacagaa tagcgtgacg gcgcctcgc cctatgcaca gccagctcc
181 accttgatg cctctctcc atcccctgcc attcccctca acacagatta ccggggccca
241 cacagcttcg atgtgtcctt ccagcagtc aagcactgcca agtcagccac ctggacgtat
301 tccaccgaac tgaagaagct gtactgccag attgcaaga catgccccat ccagatcaag
361 gtgatgacct cacccccaca gggcgctgtt atccgtgcc tgcctgtcta caagaaagct
421 gagcatgtca ccgaggttgt gaaacgatgc cctaaccatg agctgagccg tgagttcaat
481 gagggacaga ttgccctcc cagtcactctg attcgagtag aagggaacag ccatgccag
541 tatgtagaag atcctatcac ggggaaggcag agcgtgctgg tcccttatga gccaccacag
601 gttggcactg aattcacaa agtcctgtac aatttcattg gtaacagcag ctgctcgga
661 ggaatgaaca gacgtccaat ttaaatcatc gttactctgg aaaccagaga tgggcaagtc
721 ctgggccgac ggtgctttga ggcccggatc tgtgcttgcc caggaagaga ccggaaggca
781 gatgaagaca gcatcagaaa gcagcaagta tcggacagcg caaagaacgg cgatggtacg
841 aagcgccctt tccgtcagaa tacacacgga atccagatga cttccatcaa gaaacggaga
901 tccccagatg atgagctgct gtacctacca gtgagaggtc gtgagacgta cgagatgttg
961 ctgaagatca aagagtcact ggagctcatg cagtacctcc ctgagcacac gatcgaaacg
1021 tacaggcagc agcagcagca gcagcaccag cacctacttc agaaacagac ctcgatgcag
1081 tctcagtctt catatggcaa cagttcccca cctctgaaca aatgaacag catgaacaag
1141 ctgcttccg tgagccagct tatcaacca cagcagcgca atgcccctac tcccaccacc
1201 atgctgagg gcatgggagc caacattcct atgatgggca ctcacatgcc aatggctgga
1261 gacatgaatg gactcagccc taccgaagct ctccctcctc cactctccat gccctccacc
1321 tcccactgca cccaccacc gccctacccc acagACTGCA GCATTGTCAG tttcttagca
1381 aggttgggct gctcatcatg cctggactat ttcacgaccc aggggctgac caccatctat
1441 cagattgagc attactccat ggatGATTTG GCAAGTCTGA agatccctga acagttccga
1501 catgccatct ggaagggcat cctggaccac aggcagctgc acgactctc ctcacctct
1561 catctcctga ggaccccaag tgggtgctct accgtcagtg tgggctccag tgagaccctg
1621 ggtgaacgtg tgatcgatgc cgtgcgcttt accctccgcc agaccatctc tttccacccc
1681 cgtgacgagt ggaatgattt caactttgac atggattctc gtcgcaacaa gcagcagcgt
1741 atcaaagagg aaggagaaTG A

```

**Abbildung 6: Herstellung des Expressionsplasmides pcDNA3- $\Delta Np63\beta$ .**

**A:** Schematische Darstellung der *p63* Genstruktur. Die Exons sind als Kästchen, kodierende Bereiche als schwarze Kästchen gekennzeichnet (Abbildung nach (Yang et al., 1998)). **B:** Plasmidkarte des Ausgangsplasmides pcDNA3- $\Delta Np63\alpha$  und des daraus neu hergestellten Plasmides pcDNA3- $\Delta Np63\beta$ . **C:** Dargestellt ist die Sequenz des offenen Leserahmens von  $\Delta Np63\alpha$ . Die Bindungsstellen der



Oligonukleotidprimer sind fett gedruckt, der zu entfernende DNA-Bereich ist grau gedruckt und das neu entstandene STOP-Kodon rot.

Die Anzahl der Reaktionszyklen hängt von der Art der Mutation ab. Die Einführung von Punktmutationen erfordert 12, ein Aminosäureaustausch 16 und mehrere Aminosäureaustausche, Deletionen oder Insertionen, erfordern 18 Zyklen.

Der Ansatz wird anschließend mit 1 µl *DpnI* [10U] für 1h bei 37°C verdaut. Die DNA wird mittels Ethanolfällung (4.2.3.2) ankonzentriert und in kompetente *E. coli* Zellen ElectroMAX™ DH10B™ transformiert (4.1.1.1).

#### 4.2.7.2.1 Herstellung pcDNA3-ΔNp63β

Im Vergleich zu ΔNp63α handelt es sich bei ΔNp63β um eine C-terminal verkürzte Isoform, der die kodierende Region des Exon 13 fehlt (Abbildung 6). Durch das Einbringen einer Deletion in den offenen Leserahmen von ΔNp63α in pcDNA3-ΔNp63α ist es möglich, mittels ortsgerichteter Mutagenese ein Expressionsplasmid für ΔNp63β herzustellen.

Dazu wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotidprimer konstruiert (3.7), die sowohl 16 Nukleotide vor als auch 16 Nukleotide nach der zu entfernenden DNA binden können. Dadurch wird die dazwischenliegende DNA-Sequenz nicht mehr amplifiziert und fehlt in den neu synthetisierten Plasmiden. Zusätzlich kommt es zu einem Leserasterschub, der zur Verwendung eines früheren STOP-Kodons führt. Der sich daraus ergebende offene Leserahmen kodiert für ΔNp63β (Abbildung 6).

Die Mutagenese wurde wie in Kapitel 4.2.7.2 beschrieben durchgeführt. Die Amplifikation der Plasmide erfolgte über 18 PCR-Zyklen, bei denen die Synthesezeit 15min betrug.

### 4.3 Biochemische und Immunologische Methoden

#### 4.3.1 Dualer Luziferase-Reporterassay

Reporterassaysysteme sind zur Untersuchung eukaryotischer Genexpression weit verbreitet. Um die Genauigkeit der Reporterassays zu erhöhen, wurde der Duale Luziferase-Reporterassay entwickelt. Dabei unterscheidet man einen experimentellen Reporter, dessen Aktivität über die Reaktionsbedingungen reguliert wird und einen kotransfizierten Kontrollreporter, der eine Grundaktivität aufweist. Die Normalisierung der Aktivität des experimentellen Reporters mit der Aktivität der internen Kontrolle minimiert die experimentelle Variabilität, die durch äußere Einflüsse, z.B. Zellkulturbedingungen und Transfektionseffizienz, verursacht wird.

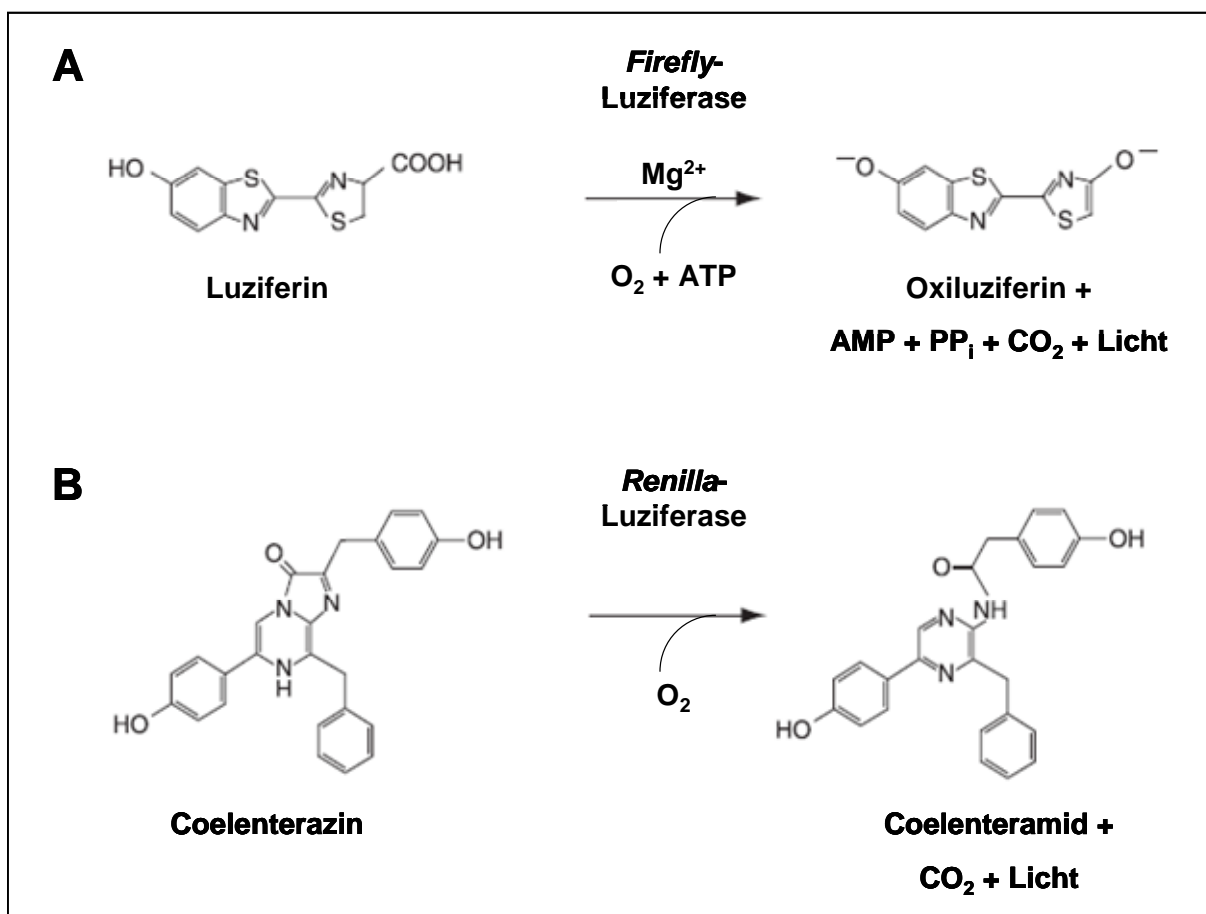
Das duale Reporterassaysystem von Promega bietet die Möglichkeit, zwei Reporterassays durchzuführen. Dabei wird die Aktivität der *Firefly*-Luziferase (*Photinus pyralis*, Glühwürmchen) und der *Renilla*-Luziferase (*Renilla reniformis*, Seeanemone) sequentiell von einer einzelnen Probe bestimmt.

Aufgrund des unterschiedlichen evolutionären Ursprungs besitzen die *Firefly*- und die *Renilla*-Luziferase verschiedene Enzymstrukturen und Substratanforderungen. Beide Proteine liegen in monomerer Form vor und sind direkt nach der Translation enzymatisch aktiv. Die *Firefly*-Luziferase hat ein Molekulargewicht von 61kDa. Ihr Substrat ist Luziferin, das in einer Reaktion, die  $Mg^{2+}$ , ATP und  $O_2$  benötigt, zu Oxiluziferin und  $CO_2$  umgesetzt wird. Dabei wird Licht einer Wellenlänge von 562nm emittiert. Das 36kDa *Renilla*-Luziferaseenzym oxidiert Coelenterazin zu Coelenteramid. Auch bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, das mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann (Abbildung 7). Da die gemessene Lichtemission proportional zur Menge an Luziferase im Zelllysate ist, kann man indirekt auf die Transkriptionsrate des Luziferasereportergens schließen.

Für einen dualen Luziferasereporterassay werden HEK-293- bzw. NCI-H1299-Zellen in einer 12 Well Zellkulturplatte ausgesät (4.1.2.1). Nach 12-24h werden die Zellen mit den *Firefly*- und *Renilla*-Luziferasereporterplasmiden sowie mit Expressionsplasmiden für Transkriptionsregulatoren transfiziert (4.1.2.3). Als interne Kontrolle wird das Reporterplasmid pRL-*tk* verwendet, das für die *Renilla*-Luziferase unter der Kontrolle des *Herpes Simplex Virus* Thymidinkinase-Promotors kodiert. Dieser Promotor ist in Säugergewebe konstitutiv auf niedriger Stufe aktiv (Stewart et al., 1987; Wagner et al., 1985). Die Zellen werden 24h nach der Transfektion (p.t.) zunächst im vorhandenen Kulturmedium abgeschabt und durch fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 3.000UpM pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 100µl 1x Passive Lysis Buffer (PLB) resuspendiert und 15min bei RT auf dem Schüttler lysiert. Die nach der Lyse übriggebliebenen Zellfragmente werden durch einminütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000UpM pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert bzw. eingefroren. Für die spätere gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (4.3.2.1) ist es möglich, nur 50µl des Überstandes für den Luziferaseassay abzunehmen. Das Pellet wird mit dem restlichen Überstand und 50µl 6x Laemmli-Puffer intensiv gemischt. Danach werden die Proben 5min bei 95°C aufgeköcht und 15min bei 4°C geschüttelt. Abschließend werden die Proben 10min bei 4°C und 14.000UpM zentrifugiert und können auf einem SDS-Gel aufgetrennt oder bei -20 °C gelagert werden.

Zur Messung der Luziferaseaktivitäten werden 20µl der Lysate in eine LumiNunc™ 96 MicroWell™ Platte pipettiert. Die Biolumineszenz der durch die *Firefly*-Luziferase bzw. die *Renilla*-Luziferase katalysierten Oxidationen von Luziferin bzw. Coelenterazin wird mittels Luminometer bestimmt. Die *Firefly*-Luziferaseaktivität wird durch automatische Injektion von

100µl Luciferase Assay Reagent II induziert. Nach 2s wird die bei der Oxidation von Luziferin freigesetzte Lumineszenz über 10s gemessen. Diese Reaktion wird durch Zugabe von 100µl Stop & Glo® Reagent gestoppt und gleichzeitig wird die *Renilla*-Luziferaseaktivität induziert. Wiederum nach 2s wird die bei der Oxidation von Coelenterazin freigesetzte Lumineszenz über 10s gemessen. Die Maßeinheit der am Luminometer ermittelten Lumineszenz ist RLU (relative light unit). Zur Auswertung der Experimente wird der Quotient aus der *Firefly*- und der *Renilla*-Luziferaseaktivität (interne Kontrolle) ermittelt und relativ zur Aktivität einer Vektorkontrolle (Transfektion eines leeren Vektors, des *Firefly*- und des *Renilla*-Luziferasereporterplasmides) dargestellt.



**Abbildung 7: Mechanismus der Luziferin- und Coelenterazin-Biolumineszenzreaktion.**

**A:** Das Substrat der *Firefly*-Luziferase ist Luziferin. Luziferin wird in einer Reaktion, die  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP und  $\text{O}_2$  benötigt, zu Oxiluziferin und  $\text{CO}_2$  unter Lichtemission umgesetzt. **B:** Das Substrat der *Renilla*-Luziferase, Coelenterazin, wird zu Coelenteramid und  $\text{CO}_2$  umgesetzt. Dabei wird ebenfalls Licht emittiert.

### 4.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und deren Visualisierung

Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Mittels Elektrophorese können Proteine unterschiedlicher Ladung und unterschiedlicher Molekülgröße aufgetrennt werden.

#### 4.3.2.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) erfolgt die Auftrennung von Proteinen unter reduzierenden Bedingungen durch diskontinuierliche Elektrophorese aufgrund ihres Molekulargewichtes. SDS ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt. Dadurch entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit (ca. 1,4g SDS pro g Protein).

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen werden die Zellen zunächst ins vorhandene Medium abgeschabt und durch Zentrifugation für 5min bei 4°C und 3.000UpM und pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment in 100µl RIPA-Puffer auf Eis lysiert. Nach Zugabe von 25µl 6x Laemmli-Puffer werden die Proben 5min bei 95°C aufgeköcht. Der Überschuss an SDS in den Proben führt zur Aufspaltung der Tertiär- und Sekundärstruktur der enthaltenen Proteine. Dies geschieht durch die Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen und der Streckung der Moleküle. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden zusätzlich durch das im 6x Laemmli-Puffer enthaltene reduzierende DTT aufgespalten. Im Anschluss werden die Proben 15min bei 4°C geschüttelt, um die DNA zu scheren. Da feste Partikel die Gelmatrix verstopfen können und so die Trennung stören, werden die Proben vor dem Auftragen 10min bei 4°C und 14.000UpM abzentrifugiert. Die Proben können daraufhin auf ein Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert werden.

Die Proteine werden auf einem vertikalen Polyacrylamidgel, bestehend aus einem 5%igen Sammelgel und einem 6-15%igen Trenngel, nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Für die Proteintrennung wird ein SDS-haltiges Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Auf analytischen SDS-Gelen können neben einem Größen-Marker bis zu 14 verschiedene Proben aufgetragen werden. Nach dem Beladen des Gels laufen die Proben bei 80V in das Sammelgel ein. Die Auftrennung der Proteine erfolgt im Trenngel bei 120V.

Für die im Ergebnisteil beschriebenen Experimente wurden 0,75 mm dicke Polyacrylamidgele mit 10%igen Trenngelen benutzt. Neben 7µl des Größenstandards BenchMark™ Protein Ladder wurden auf Gele mit 10 Probentaschen 20µl, mit 12 Taschen 15µl und mit 15 Taschen 10µl Zelllysate aufgetragen.

## Methoden

Sammelgel (5% Polyacrylamid):	3,40 ml	dH <sub>2</sub> O
	0,83 ml	rotiphorese® Gel 30
	0,68 ml	Sammelgelpuffer
	0,05 ml	10% APS
	0,005 ml	TEMED
Trenngel (10% Polyacrylamid):	4,0 ml	dH <sub>2</sub> O
	3,3 ml	rotiphorese® Gel 30
	2,6 ml	Trenngelpuffer
	0,1 ml	10% APS
	0,004 ml	TEMED

#### 4.3.2.2 Western Blot

Der Western Blot (WB) ist eine empfindliche Methode zur Immundetektion von Proteinen, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Nachweisgrenze der Proteine liegt bei wenigen fg Protein. Da mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (AK) nur das Antigen erkannt und detektiert wird, ist es möglich, eine Aussage über ein Protein in einem komplexen Gemisch zu treffen, ohne es vorher aufzureinigen.

Dazu werden die Proteine irreversibel auf eine Nitrocellulose-Membran (NC) übertragen. Nassblot-Schwämme und 6,5×9,5cm große 3MM-Whatman-Papiere werden 10min in Transferpuffer eingeweicht. Die 6×9cm große NC-Membran wird 1min in dH<sub>2</sub>O geschwenkt.

Aufbau:

**Anode**  
 Schwamm  
 3 Blatt 3MM-Whatman-Papier  
 Nitrocellulose-Membran  
 Polyacrylamidgel  
 3 Blatt 3MM-Whatman-Papier  
 Schwamm  
**Kathode**

Um einen exakten Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran zu erzielen, müssen Luftblasen entfernt werden. Der Blot wird in einem Plastikhalter fixiert und in einer Transferkammer mit Transferpuffer überschichtet. Die Übertragung erfolgt bei 37V über Nacht. Am nächsten Tag wird die Membran 1h bei RT auf dem Schüttler in Blockinglösung abgesättigt und anschließend 2h mit dem Erstantikörper in Blockinglösung inkubiert. Durch das Absättigen werden unspezifische Antikörperbindungen an die Membran vermieden.

Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen entfernt: 10min in PBS-T, 15min in Blockinglösung, 10min in PBS-T. Anschließend wird die Membran 1h mit dem Zweitantikörper in Blockinglösung bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Zweitantikörperinkubation wird die Membran 10min in PBS-T, 15min in Blockinglösung und dreimal 5min in PBS<sub>def.</sub> gewaschen. Zum Nachweis phosphorylierter Proteine mit Phosphospezifischen Antikörpern wird PBS<sub>def.</sub> durch TBS ersetzt. Zum Schluss werden je 250µl SuperSignal® West Dura bzw. Femto Stable Peroxide Buffer und Luminol/Enhancer-Solution gemischt und auf der Membran verteilt. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Membran luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm exponiert. Je nach Stärke des Signals variieren die Expositionszeiten zwischen 1s und 8h (über Nacht).

#### 4.3.2.2.1 Entfernen von Antikörpern von NC-Membranen („Strippen“)

Um Primär- und Sekundärantikörper von einer bereits mit Antikörpern inkubierten NC-Membran zu entfernen, wird diese in einem geschlossenen Gefäß vollständig mit *Stripping*-Puffer bedeckt und 30-45min bei 50°C inkubiert. Im Anschluss wird die Membran dreimal 10min in PBS-T gewaschen. Nach der Absättigung unspezifischer Bindungen durch die Inkubation in Blockinglösung ist die NC-Membran zur erneuten Färbung bereit (4.3.2.2). Bei dieser Methode ist zu beachten, dass neben den Antikörpern auch ein Teil der Proteine auf der Membran entfernt werden.

#### 4.3.3 Immunpräzipitation

Proteine und Protein-Komplexe werden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen über Protein A-Sepharose (PAS) gefällt.

Zur Äquilibration der PAS werden 500mg PAS in 8ml Co-IP-Puffer aufgenommen, gut gemischt und 1h bei RT inkubiert. Die gequollene Sepharose wird 1min bei RT und 5.000UpM abzentrifugiert und dreimal mit 2ml Co-IP-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wird das PAS-Pellet in 1VT Co-IP-Puffer aufgenommen und kann bei 4°C gelagert werden.

Für die Immunpräzipitation (IP) werden NCI-H1299-Zellen in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät (4.1.2.1) und 12-24h später transfiziert (4.1.2.3). 24h p.t. werden die Zellen in das vorhandene Wachstumsmedium abgeschabt und in ein 50ml Röhrchen überführt. Die folgenden Arbeitsschritte werden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen werden 10min bei 800UpM abzentrifugiert. Anschließend wird das Medium abgesaugt und das Zellpellet in 1ml eiskaltem Co-IP-Lysispuffer resuspendiert. Der Co-IP-Lysispuffer enthält verschiedene Proteaseinhibitoren, um zu verhindern, dass die Proteine während der IP abgebaut werden. Die Suspension wird in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und 2min sonifiziert. Um eine effiziente Lyse der Zellen zu erzielen, wird das Lysat zusätzlich fünfmal durch eine

Insulinspritze gezogen. Die nach der Lyse übriggebliebenen Zellfragmente werden durch anschließende Zentrifugation für 10min bei 14.000UpM pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um unspezifische Proteininteraktionen mit der PAS zu vermeiden, werden die Lysate mit 50µl PAS 1h auf dem Überkopfschüttler inkubiert und anschliessend 5min bei 14.000UpM abzentrifugiert (Präadsorption). Vom Überstand werden 30µl als input-Kontrolle entnommen und mit 30µl 6x Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5min bei 95°C aufgekocht und 15min bei 4°C geschüttelt (4.3.2.1). Das restliche Lysat wird entsprechend der Anzahl der Präzipitationen (Antikörper) gleichmäßig auf mehrere 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt und mit Co-IP-Puffer auf jeweils 500µl aufgefüllt. Danach wird das vorgereinigte Lysat 2h mit 1µg der spezifischen Antikörper auf dem Überkopfschüttler inkubiert (Antigen-Antikörper-Reaktion). Im Anschluss erfolgt die Kopplung der Antigen-Antikörper-Komplexe an die PAS. Dazu werden die Proben kurz abzentrifugiert, mit 25µl PAS versehen und 1h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Protein-PAS-Komplexe werden 2min bei 3.000UpM pelletiert und einmal mit 800µl Co-IP-Lysispuffer, zweimal mit 800µl Co-IP-Puffer und zweimal mit 500µl Co-IP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die PAS bei 14.000UpM abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird in 25µl 6x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, 5min bei 95°C aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.3.2.1). Der Nachweis der präzipitierten und kopräzipitierten Proteine erfolgt über WB (4.3.2.2). Dabei wird die NC-Membran zunächst mit Antikörpern gegen mögliche kopräzipitierte Proteine inkubiert und gefärbt, gestrippt (4.3.2.2.1) und zum Schluss mit Antikörpern gegen die präzipitierten Proteine nachgefärbt.

IP	WB 1	WB 2	WB 3
$\alpha$ - $\beta$ -Gal	$\alpha$ - $\beta$ -Catenin	$\alpha$ -Tcf-4	$\alpha$ -p63
$\alpha$ -Tcf-4	$\alpha$ - $\beta$ -Catenin	$\alpha$ -p63	$\alpha$ -Tcf-4
$\alpha$ -p63	$\alpha$ - $\beta$ -Catenin	$\alpha$ -Tcf-4	$\alpha$ -p63

#### 4.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz werden Proteine in der Zelle sichtbar gemacht. Die indirekte Immunfluoreszenz beruht auf zwei Antigen-Antikörper-Bindungen. Der Erstantikörper erkennt und bindet das Zielprotein. Der Zweitantikörper ist gegen den Erstantikörper gerichtet und trägt zusätzlich einen Fluoreszenzfarbstoff. Dieser wird durch das UV-Licht des Fluoreszenzmikroskopes angeregt, wodurch die Lokalisation des von dem Erstantikörper gebundenen Proteins angezeigt wird.

NCI-H1299-Zellen werden in einem 4 Well Objektträger ausgesät (4.1.2.1) und 12-24h später transfiziert (4.1.2.3). 24h p.t. werden die Zellen einmal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und in 200µl 3% (w/v) Paraformaldehyd in PBS<sup>++</sup> 30min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit

PBS<sup>++</sup> werden die Zellen in 200µl 0,2% Triton X-100 in PBS<sup>++</sup> 25min permeabilisiert. Dieser Schritt entfällt, wenn Oberflächenproteine gefärbt werden. Im Anschluss werden die Zellen viermal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und in 200µl Blockinglösung 10min inkubiert. Das FCS geht unspezifische Bindungen mit den zellulären Proteinen ein und sättigt diese ab. Dadurch steigt die Spezifität der folgenden Antigen-Antikörperbindung. Der Erstantikörper wird in Blockinglösung verdünnt und die Zellen werden mit 200µl der Antikörperlösung überschichtet. Nach 1h Inkubation wird der Antikörper durch dreimaliges Waschen (zweimal kurz, einmal 5min) mit PBS<sup>++</sup> entfernt. Der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wird ebenfalls in Blockinglösung verdünnt. Die Zellen werden mit dem Zweitantikörper 30min im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal gewaschen (zweimal kurz, einmal 5min). Zum Schluss werden die Chromosomen und damit die Zellkerne mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. Dazu werden die Zellen im Dunkeln 5-10min mit 100ng/ml DAPI in PBS<sup>++</sup> überschichtet. Nach einem letzten Waschschrift werden die Kammern des Objektträgers entfernt und die Zellen mit Fluoprep mit 2,5% (w/v) DABCO überschichtet und mit einem Deckglas versehen. DABCO zögert das Ausbleichen der Fluoreszenz hinaus, so dass sich das Fluoreszenzsignal bei Lagerung der Objektträger bei 4°C 1-2 Monate detektieren lässt.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Das p53-Homolog $\Delta$ Np63 $\alpha$ aktiviert spezifisch die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription und greift in den kanonischen Wnt-Signalweg ein.

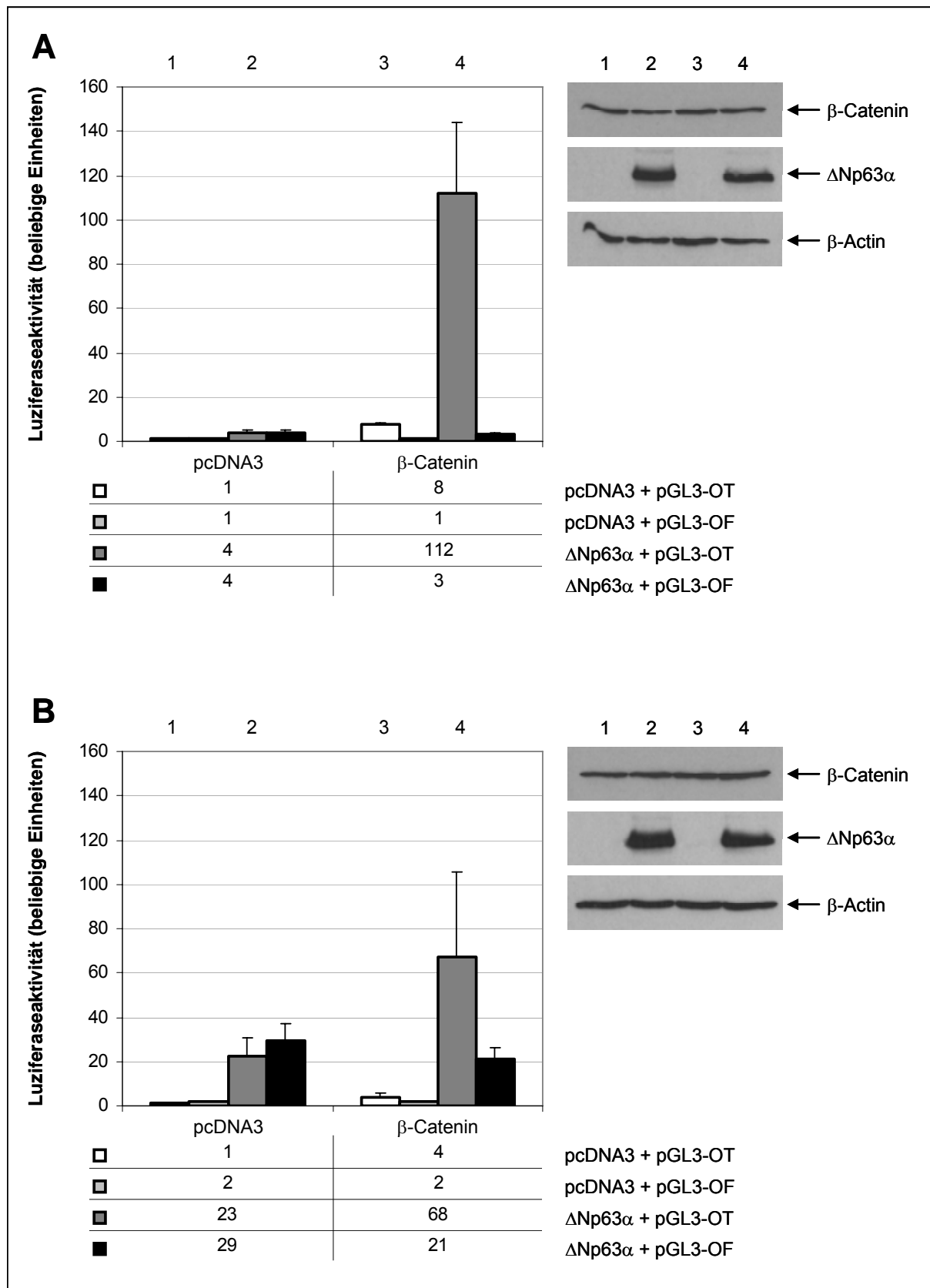
$\Delta$ Np63 $\alpha$  stellt eine Isoform der p53-homologen p63-Proteine dar. Der N-terminal verkürzten p63-Isoform fehlt im Vergleich zu p53 die N-terminale saure TAD. C-terminal befindet sich als zusätzliche Proteindomäne ein steriles  $\alpha$ -Motiv. Für  $\Delta$ Np63 $\alpha$  wurde beschrieben, dass es die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und die CRT aktiviert (Patturajan et al., 2002).

Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchungen war die Frage, welche Rolle das p53-homologe Protein  $\Delta$ Np63 $\alpha$  im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg, speziell bei der CRT spielt.

#### 5.1.1 $\Delta$ Np63 $\alpha$ aktiviert einen $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotor.

Um den Einfluss von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  auf die CRT zu untersuchen, wurde ein  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsives Luziferase-Reporterassay-System etabliert (4.3.1). HEK-293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) und NCI-H1299-Zellen (humane Großzellen-Lungenkarzinomzellen) weisen nur geringe endogene CRT auf und eignen sich damit zur Untersuchung des Wnt-Signaltransduktionsweges (Brunori et al., 2001; Morin et al., 1997). Beide Zelllinien wurden mit zwei verschiedenen Reporterplasmiden in verschiedenen Kombinationen mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  transfiziert (4.1.2.3). pGL3-OT kodiert für die *Firefly*-Luziferase unter Kontrolle eines minimalen *c-Fos*-Promotors, dem drei Kopien der optimalen Tcf-Erkennungssequenz CCTTTGATC vorgeschaltet wurden. Im Gegensatz dazu enthält der Reporter pGL3-OF drei Kopien der mutierten und damit inaktiven Tcf-Konsensussequenz CCTTTGGCC (He et al., 1998; Korinek et al., 1997; van de Wetering et al., 1991). Als interne Kontrolle wurde zusätzlich das Reporterplasmid pRL-*tk* kotransfiziert, das für die *Renilla*-Luziferase unter der Kontrolle des *Herpes Simplex Virus* Thymidinkinase-Promotors kodiert. 24h p.t. wurden die Zellen lysiert (4.3.1) und die Biolumineszenz der *Firefly*- und der *Renilla*-Luziferase der Lysate mittels Luminometer bestimmt. In Abbildung 8 sind die Quotienten aus der *Firefly*- und der *Renilla*-Luziferaseaktivität relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle (pcDNA3 = 1) des Reporters pGL3-OT dargestellt. Die mit pGL3-OT transfizierten Proben wurden anschließend für einen WB aufbereitet, mittels SDS-PAGE (4.3.2.1) aufgetrennt und auf eine NC-Membran übertragen (4.3.2.2).  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  wurden mit spezifischen AK nachgewiesen. Zur Kontrolle gleicher Proteinmengen wurde das ubiquitär exprimierte Protein  $\beta$ -Actin nachgewiesen. Dazu

wurde die Membran zuerst mit einem AK gegen  $\beta$ -Catenin gefärbt, gestrippt (4.3.2.2.1) und anschließend mit einem AK gegen p63 und einem AK gegen  $\beta$ -Actin nachgefärbt.



### Abbildung 8: $\Delta$ Np63 $\alpha$ -vermittelte Transkriptionsaktivierung eines $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotors.

7,5x10<sup>4</sup> 293-Zellen (A) bzw. 1,0x10<sup>5</sup> H1299-Zellen (B) wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor (pcDNA3), 400ng pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$ , 160ng pCneo- $\beta$ -Catenin und 200ng des  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Reporterplasmides pGL3-OT bzw. des mutierten Reporterplasmides pGL3-OF transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng des internen Kontrollplasmides pRL-tk versehen, welches konstitutiv die *Renilla*-Luziferase exprimiert, und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Die Zellen wurden 24h p.t. geerntet und lysiert. Die Expression des Reporters, der *Firefly*-Luziferase, und der internen Kontrolle, der *Renilla*-Luziferase, wurde anschließend durch Messung der Biolumineszenzwerte beider Luziferasen ermittelt. Die Quotienten aus der *Firefly*- und der *Renilla*-Luziferaseaktivität sind relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle des Reporters pGL3-OT dargestellt. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente. Die Lysate der mit 1-4 gekennzeichneten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran übertragen. Die Expression der Proteine  $\beta$ -Catenin (92kDa) und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (80kDa) wurde mit spezifischen AK nachgewiesen. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung (42kDa) wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt. Dazu wurde die NC-Membran zuerst mit einem AK gegen  $\beta$ -Catenin gefärbt, gestrippt und anschließend mit einem AK gegen p63 und einem AK gegen  $\beta$ -Actin nachgefärbt.

Wie zu erwarten war, wird in 293-Zellen der  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsive Reporter, die *Firefly*-Luziferase, durch transiente Überexpression von  $\beta$ -Catenin 8-fach verstärkt, während die Überexpression von  $\beta$ -Catenin den mutierten Tcf-responsiven Promotor nicht transaktivieren kann (Abbildung 8A).  $\Delta$ Np63 $\alpha$  alleine ist in der Lage, die CRT zu vervierfachen. Werden  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  gemeinsam überexprimiert, steigt die Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Reporters auf das 112-fache an, d.h.,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  verstärkt die durch  $\beta$ -Catenin-Synthese hervorgerufene Aktivität noch einmal 14-fach. Im Gegensatz dazu hat  $\Delta$ Np63 $\alpha$  keinen Einfluss auf die Aktivität des mutierten Tcf-responsiven Promotors in pGL3-OF. Unabhängig von diesen Beobachtungen unterscheiden sich die endogenen und exogenen  $\beta$ -Catenin-Proteinmengen der einzelnen Lysate im WB nicht, obwohl anhand der  $\beta$ -Actin-Färbung zu erkennen ist, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden. Im Widerspruch zu Patturajan *et al.* hat  $\Delta$ Np63 $\alpha$  keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Catenin-Proteinmenge (Patturajan *et al.*, 2002).

In H1299-Zellen zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 8B). Die transiente Überexpression von  $\beta$ -Catenin transaktiviert den Tcf-responsiven Promotor 4-fach.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  alleine führt zu einem 23-fachen Anstieg der Luziferaseaktivität, während die gemeinsame Überexpression von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die Aktivität des Reporters auf das 68-fache verstärkt. Auch in diesem Fall verstärkt  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die durch  $\beta$ -Catenin-Synthese hervorgerufene Aktivität noch einmal deutlich, und zwar 17-fach. Anders als in 293-Zellen aktiviert  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in H1299-Zellen auch die Negativkontrolle, das nicht mehr Tcf-responsive Reportergen in pGL3-OF 29-fach. Diese Aktivierung erfolgt unabhängig von  $\beta$ -Catenin, da die Koexpression von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  zu keiner weiteren Verstärkung der Luziferaseaktivität führt (21-fach). Betrachtet man die Proteinmengen von  $\beta$ -Catenin in den

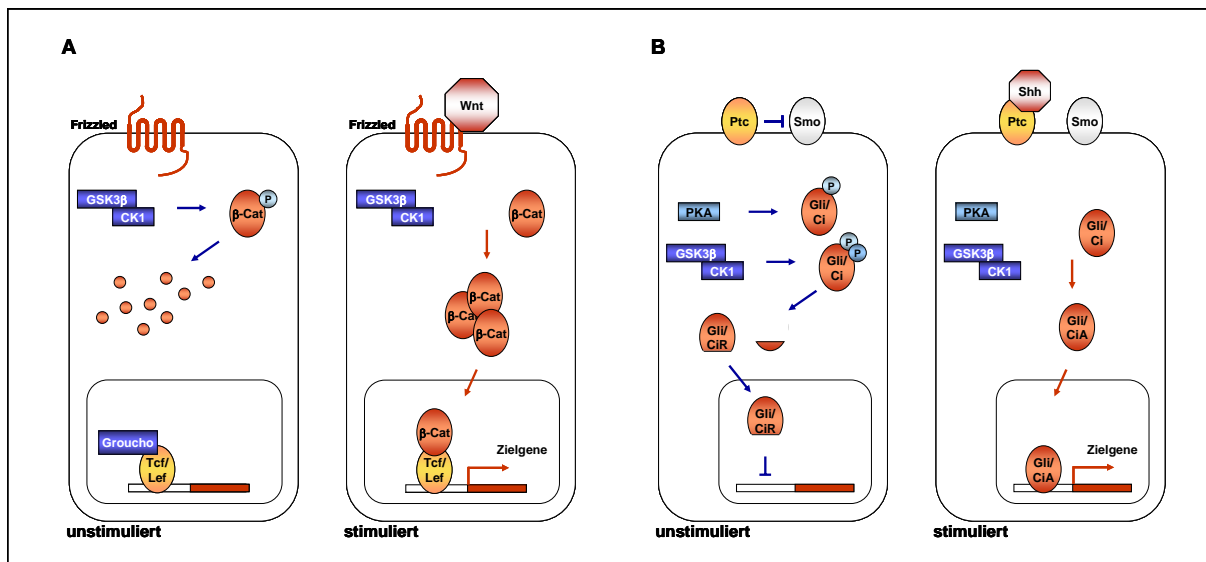
verschiedenen Lysaten, so unterscheiden sich die endogenen und exogenen  $\beta$ -Catenin-Proteinmengen ebenso wenig wie in 293-Zellen. Die  $\beta$ -Actin-Färbung zeigt, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden. Auch in H1299-Zellen hat  $\Delta$ Np63 $\alpha$  also keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Catenin-Proteinmengen.

Mit Hilfe eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Luziferase-Reporterassay-Systems konnte gezeigt werden, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  einen  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotor aktiviert und dessen Aktivität in Kooperation mit  $\beta$ -Catenin deutlich steigert.

### 5.1.2 $\Delta$ Np63 $\alpha$ ist nicht in der Lage, die Gli-1-regulierte Transkription des Sonic-Hedgehog-Signalweges zu aktivieren

In den letzten Jahren haben Untersuchungen ergeben, dass der Wnt-Signaltransduktionsweg wesentliche Gemeinsamkeiten mit dem Hedgehog-Signalweg aufweist (Huelsenken and Birchmeier, 2001; Ingham and McMahon, 2001). Wie in Abbildung 9 dargestellt, werden beide Signaltransduktionswege durch sezernierte Wachstumsfaktoren, Wnt bzw. Sonic-Hedgehog (Shh), über membrangebundene Rezeptoren, Fz bzw. Smoothed (Smo), aktiviert. Die Aktivierung der Signalwege verhindert den phosphorylierungsabhängigen Abbau der Effektoren  $\beta$ -Catenin bzw. Gli/Ci (Gli 1-3 in *Vertebrata*, Cubitus interruptus in *Drosophila*), wodurch ein DNA-bindendes Protein von einem transkriptionellen Repressor zu einem Aktivator der Transkription wird, Tcf/Lef bzw. Gli/Ci. Im inaktiven Zustand werden die Effektoren durch GSK3- $\beta$  und CK-1 phosphoryliert und in beiden Fällen dem SCF-Ubiquitin-Ligasekomplex zugeführt (Kalderon, 2002).

Um der Frage nachzugehen, ob  $\Delta$ Np63 $\alpha$  spezifisch die CRT aktiviert oder ob es auch eine Funktion bei der Gli-1-regulierten Transkription ausübt, wurden subkonfluente H1299-Zellen mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-Promoter bzw. 8x3'Gli-BS $\delta$ 51LucII in verschiedenen Kombinationen mit Expressionsplasmiden für Gli-1 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  transfiziert. Im Reporterplasmid pGL3-Promoter steht die Transkription der *Firefly*-Luziferase unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Da das Plasmid kein Gli-1-responsives Element enthält, dient es als Negativkontrolle. Das für den Shh-Signalweg spezifische Reporterplasmid 8x3'Gli-BS $\delta$ 51LucII enthält acht aufeinanderfolgende Kopien eines Sequenzmotivs aus dem Enhancer für die bodenplattenspezifische Expression von *HNF-3 $\beta$*  (*Hepatocyte Nuclear Factor-3 $\beta$* ) GAACACCCA, das der Konsensussequenz der humanen Gli-1 Bindungsstelle GACCACCCA ähnelt (Sasaki et al., 1997), gefolgt von der Sequenz des minimalen  $\delta$ 1-*Crystallin*-Promotors (Kamachi and Kondoh, 1993). Die Zellen wurden 24h p.t. geerntet und lysiert, gefolgt von einem dualen Luziferaseassay.

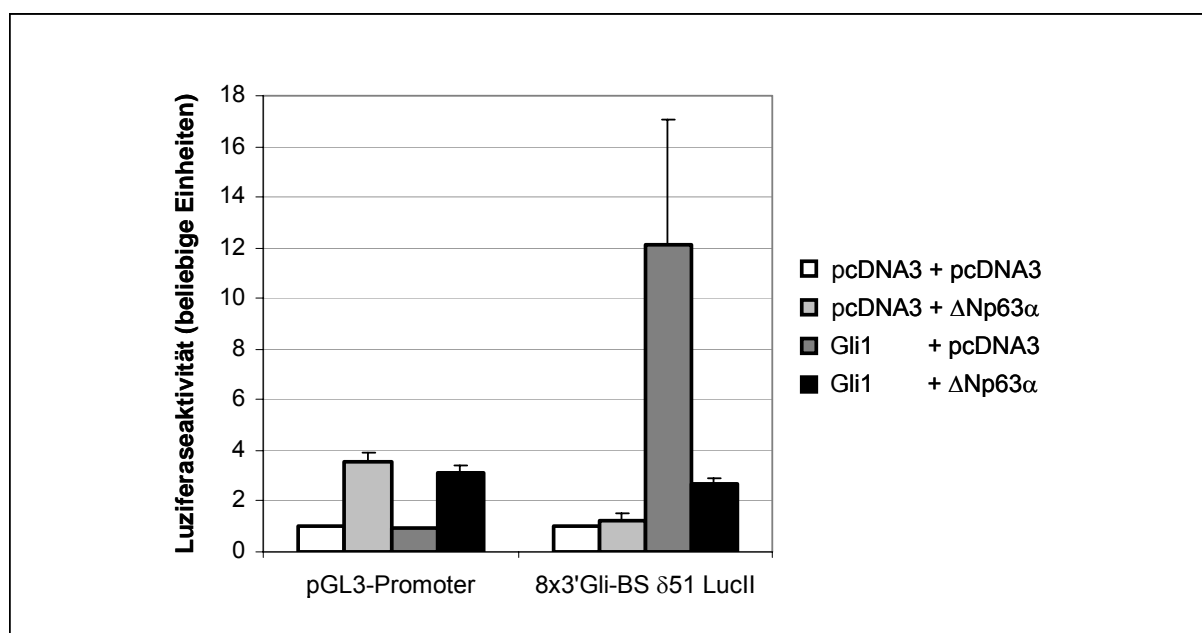


**Abbildung 9: Wnt- und Shh-Signaltransduktion.**

**(A) Wnt-Signaltransduktionsweg.** Unstimuliert: Zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin wird durch einen Multiproteinkomplex bestehend aus Axin, APC, GSK3- $\beta$  und CK-1 phosphoryliert und durch anschließende Ubiquitinierung dem proteosomalen Abbau zugeführt. Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren binden zusammen mit anderen Proteinen (u.a. Groucho-Faktoren) als Repressorkomplexe an  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsive Promotoren. Stimuliert: Sezernierte Wnt-Glykoproteine binden an zelluläre Fz-Rezeptoren und setzen dadurch eine Signalkaskade in Gang, die die Phosphorylierung und damit auch den Abbau von  $\beta$ -Catenin verhindert.  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytoplasma, wird in den Zellkern transportiert und aktiviert im Komplex mit Tcf/Lef die Transkription  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsiver Gene. **(B) Shh-Signaltransduktionsweg.** Unstimuliert: Der Shh-Rezeptor Patched (Ptc) interagiert direkt oder indirekt mit dem Membranprotein Smo, das als Signalgeber dient, und inhibiert dessen Funktion. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor Gli/Ci durch die Proteinkinase A (PKA), GSK3- $\beta$  und CK-1 mehrfach phosphoryliert und durch nachfolgende Ubiquitinierung der partiellen Proteolyse zugeführt. Auf diese Weise trunkierte Gli/Ci-Proteine fungieren im Zellkern als transkriptionelle Repressoren Gli/Ci-responsiver Gene. Stimuliert: Sezernierte Shh-Proteine binden an den Rezeptor Ptc und heben die Repression von Smo auf. Die Signaltransduktion über Smo verhindert die partielle Proteolyse von Gli/Ci-Faktoren, die in den Zellkern transportiert, nunmehr die Transkription Gli/Ci-responsiver Gene aktivieren.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, hat Gli-1 keinen Einfluss auf die SV40-Promotoraktivität, während es die Transkription des Shh-spezifischen Reportergens 12-fach verstärkt.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ist weder in der Lage die Gli-1-regulierte Transkription zu aktivieren, noch kann es mit Gli-1 kooperieren. Die Koexpression von Gli-1 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  führt vielmehr zu einer Repression der Transkription des Gli-1-spezifischen Reportergens auf ein Viertel der durch Gli-1-induzierten Aktivität. Dagegen verstärkt  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die durch den SV40-Promotor gesteuerte Transkription 4-fach.

$\Delta$ Np63 $\alpha$  ist somit kein Aktivator des Shh-Signalweges, speziell der Gli-1-regulierten Transkription.



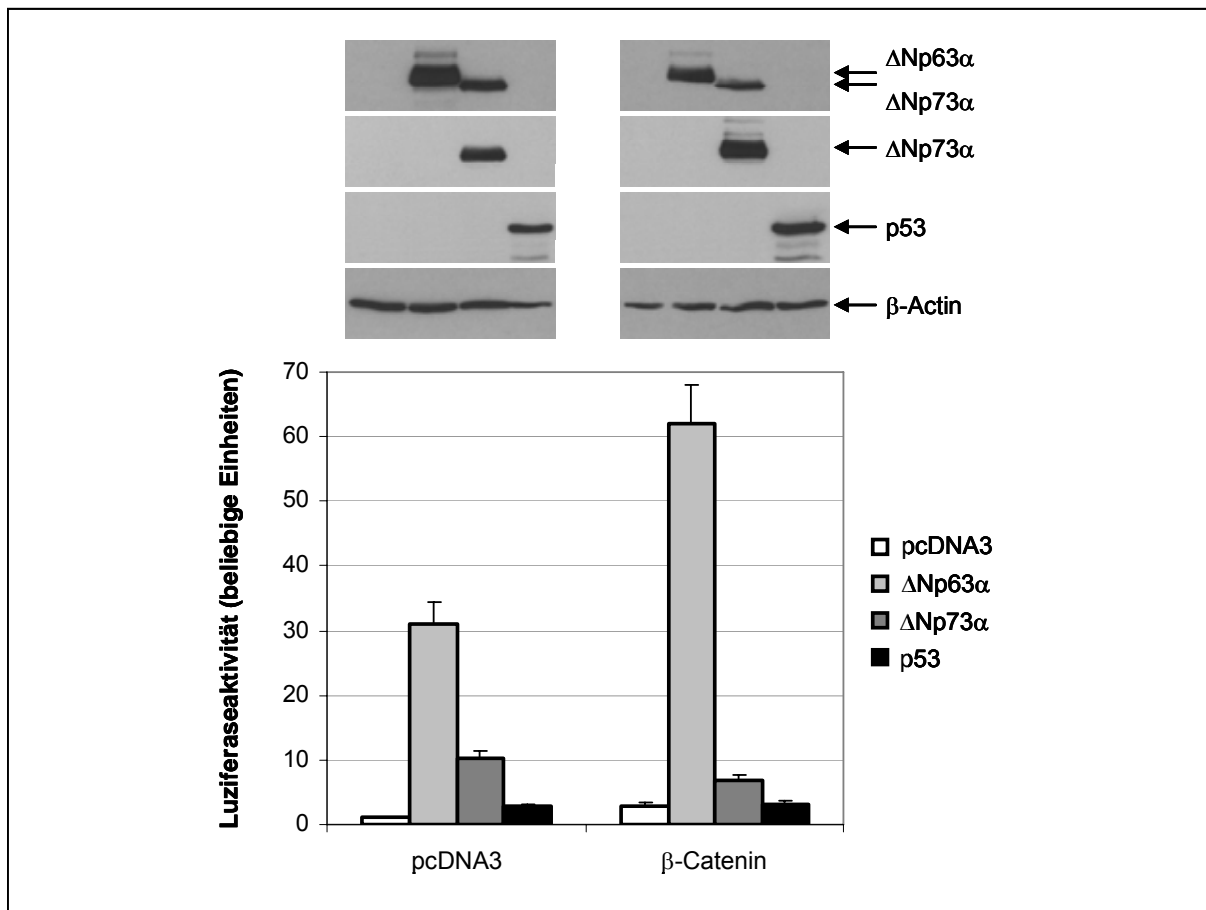
**Abbildung 10: Untersuchung der Transkriptionsaktivierung eines Gli-1-responsiven Promotors durch  $\Delta Np63\alpha$ .**

$1,0 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng pcDNA3- $\Delta Np63\alpha$ , 160ng pcDNA3-Gli-1 und 200ng des Gli-1-responsiven Reporterplasmides 8x3'Gli-BS  $\delta 51$  LucII bzw. des Reporterplasmides pGL3-Promoter, dessen Luziferase-Gen durch den SV40-Promotor gesteuert wird, transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng pRL-*tk* versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luziferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind jeweils relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle der Reporter dargestellt.

### 5.1.3 Die $\Delta Np63\alpha$ -Homologen $\Delta Np73\alpha$ und p53 aktivieren die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription nicht in demselben Maße wie $\Delta Np63\alpha$

Die homologen Proteine  $\Delta Np63\alpha$ ,  $\Delta Np73\alpha$  und p53 weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Während  $\Delta Np63\alpha$  und  $\Delta Np73\alpha$  im Vergleich zu p53 die aminoterminal TAD fehlt, tragen sie C-terminal eine zusätzliche Proteindomäne, eine SAM-Domäne. Die Aminosäureidentität beträgt zwischen p63/p73 und p53 innerhalb der DBD ~60% / 63% und innerhalb der Oligomerisierungsdomäne ~37% / 38%. Insgesamt sind p63 und p73 zueinander homologer als zu p53. Die Sequenz-Identität der OD von p63 und p73 beträgt ~65%, die der DBD ~87% (Chen, 1999). Das legt die Frage nahe, ob  $\Delta Np73\alpha$  die CRT vergleichbar mit  $\Delta Np63\alpha$  aktivieren kann und welche Funktion p53 in diesem Signalweg einnimmt.

Um diese Frage zu beantworten, wurden subkonfluente H1299-Zellen mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-OT, sowie mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin und  $\Delta Np63\alpha$ ,  $\Delta Np73\alpha$  oder p53 transfiziert und 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die Expression von  $\Delta Np63\alpha$  und seinen Homologen wurde mittels WB analysiert.



**Abbildung 11: Untersuchung der Transkriptionsaktivierung eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotors durch die  $\Delta Np63\alpha$ -Homologen  $\Delta Np73\alpha$  und p53.**

1,0x10<sup>5</sup> H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng pcDNA3- $\Delta Np63\alpha$ , 400ng pcDNA3- $\Delta Np73\alpha$ , 400ng pRC-CMV-p53, 160ng pCneo- $\beta$ -Catenin und 200ng pGL3-OT transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng pRL-*tk* versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luziferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle des Reporters dargestellt. Die Expression von  $\Delta Np63\alpha$  und seinen Homologen wurde mittels WB mit AK gegen p63 (erste Reihe), p73 (zweite Reihe) und p53 (dritte Reihe) nachgewiesen. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt. Die WB-Färbungen wurden nacheinander entsprechend der dargestellten Reihenfolge durchgeführt. Nach jeder Färbung wurde die NC-Membran gestriipt.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, aktiviert  $\Delta Np63\alpha$  die CRT der *Firefly*-Luziferase 31-fach. Nach Koexpression von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta Np63\alpha$  steigt die Luziferaseaktivität auf das 62-fache, d.h.,  $\Delta Np63\alpha$  verstärkt die durch  $\beta$ -Catenin-Synthese hervorgerufene Aktivität (3-fach) noch einmal 21-fach. Im Vergleich zu  $\Delta Np63\alpha$  führt die Einzelexpression von  $\Delta Np73\alpha$  zu einer geringeren Aktivierung der CRT, 10-fach.  $\Delta Np73\alpha$  ist nicht in der Lage, mit  $\beta$ -Catenin bei der Transkriptionsaktivierung zu kooperieren. Nach Koexpression beider Proteine wird die Luziferaseaktivität lediglich versiebenfacht. Da p53 bereits als negativer Regulator des Wnt-Signaltransduktionsweges beschrieben wurde (Cagatay and Ozturk, 2002; Levina et al.,

2004; Liu et al., 2001; Rother et al., 2004; Sadot et al., 2001), überrascht das Ergebnis der vorliegenden Luziferaseassays: Die Expression von p53 führt in H1299-Zellen nicht zu einer Repression der CRT. Einzeln exprimiert ist sogar ein leichter Anstieg der CRT, 3-fach, zu verzeichnen. In Kombination mit  $\beta$ -Catenin bleibt die CRT durch p53 unbeeinflusst. Im WB erkennt der p63-spezifische AK neben  $\Delta\text{Np63}\alpha$  auch  $\Delta\text{Np73}\alpha$ . Letzteres wurde zusätzlich mit Hilfe eines AK gegen p73 $\alpha$  nachgewiesen.

Sowohl  $\Delta\text{Np73}\alpha$  als auch p53 können die CRT nicht in dem Maße aktivieren wie  $\Delta\text{Np63}\alpha$ . Damit wird die Spezifität der Funktion von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg bei der CRT unterstrichen.

#### **5.1.4 Nur tetramere $\Delta\text{Np63}$ -Isoformen sind in der Lage, die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription zu aktivieren**

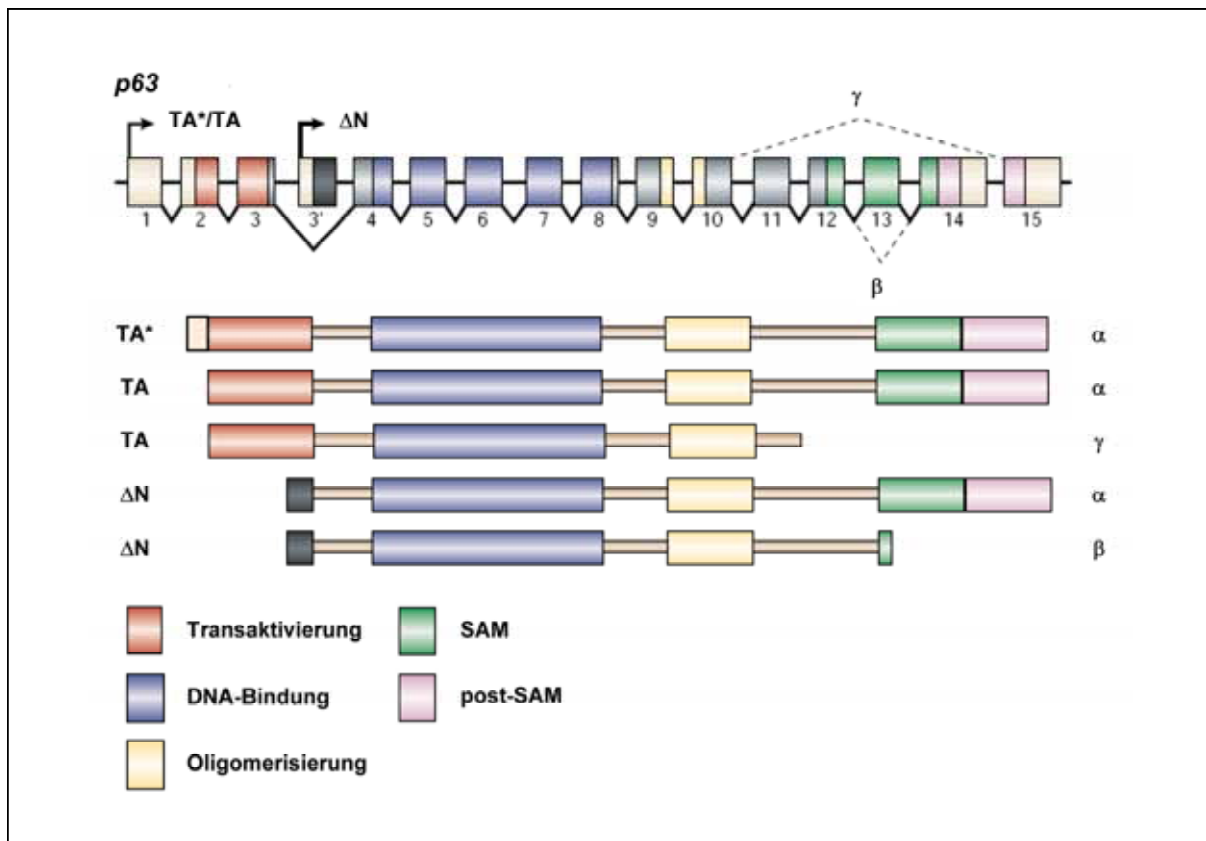
Nachdem gezeigt werden konnte, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  spezifisch die CRT aktiviert, stellt sich nun die Frage, wie sich andere p63-Isoformen verhalten und welche Proteindomänen für die Aktivierung der CRT notwendig sind.

##### **5.1.4.1 $\Delta\text{Np63}\alpha$ und $\Delta\text{Np63}\beta$ sind starke Aktivatoren der $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkription**

Um die Rolle verschiedener p63-Isoformen bei der CRT zu untersuchen, wurden Expressionsplasmide für TA\*p63 $\alpha$ , TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\gamma$ ,  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und  $\Delta\text{Np63}\beta$  (Abbildung 12) im CRT-spezifischen dualen Luziferaseassaysystem untersucht.

Im Vergleich zu  $\Delta\text{Np63}\alpha$  besitzen TA\*p63 $\alpha$  und TAp63 $\alpha$  eine N-terminale saure TAD (Abbildung 12). TAp63-Transkripte kodieren neben TAp63 für TA\*p63, welches einen um 39-AS verlängerten N-Terminus besitzt und dem humanen KET entspricht (Augustin et al., 1998; Yang et al., 1998). TAp63 $\gamma$  besitzt ebenfalls eine N-terminale TAD, ist aber C-terminal um die SAM-Domäne verkürzt. TAp63 $\gamma$  weist die größten Homologien zu p53 auf.  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und  $\Delta\text{Np63}\beta$  unterscheiden sich am C-Terminus.  $\Delta\text{Np63}\beta$  ist C-terminal verkürzt und besitzt nicht mehr die vollständige SAM-Domäne.



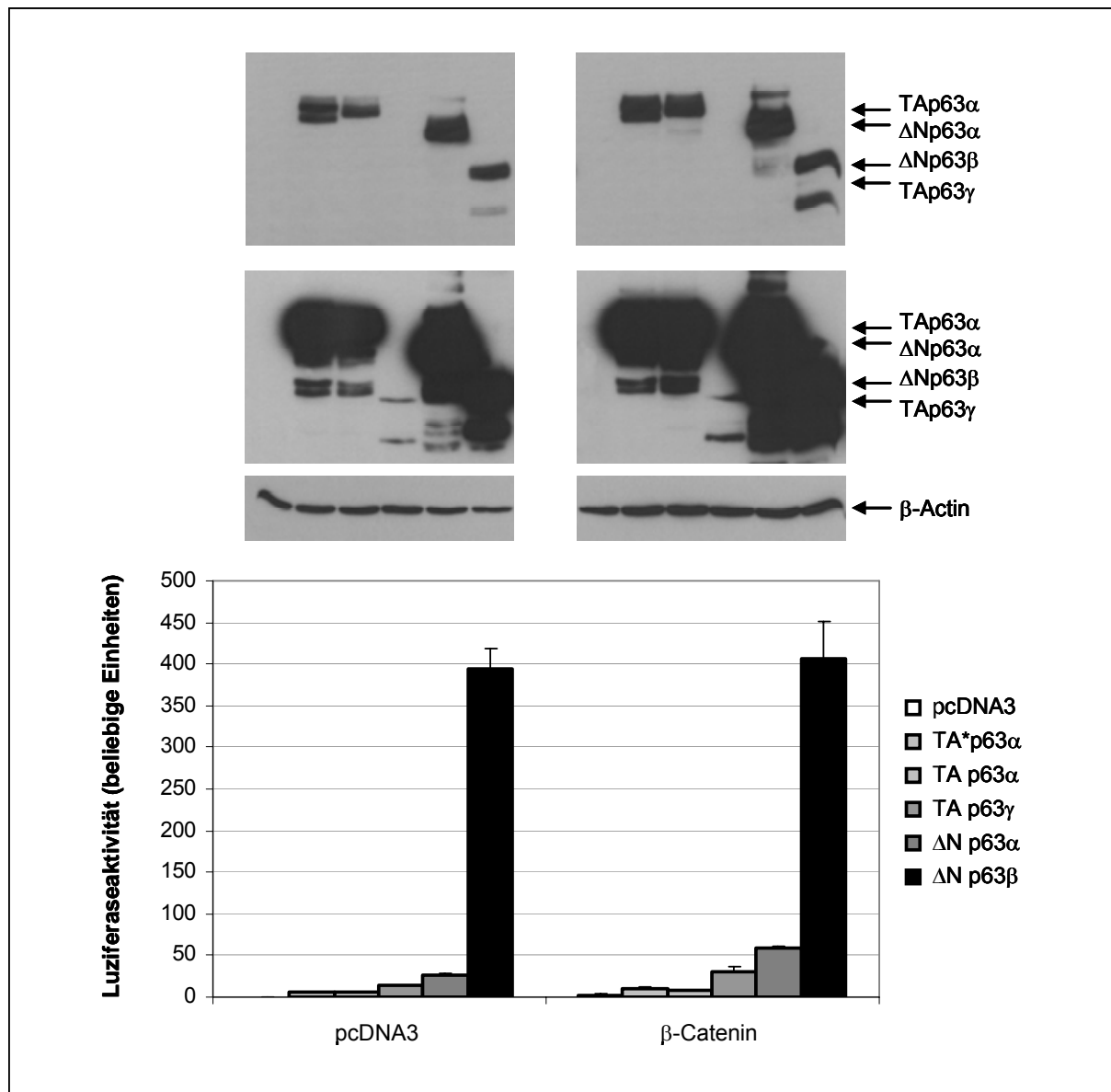


**Abbildung 12: Schematische Darstellung von p63-Isoformen**

Die in Abbildung 13 untersuchten p63-Isoformen sind schematisch dargestellt. Die TAD, DBD, OD und SAM-Domäne der einzelnen Isoformen ist farblich hervorgehoben. Abbildung in Anlehnung an Yang and McKeon 2000 (Yang and McKeon, 2000).

Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-OT und Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin und TA\*p63 $\alpha$ , TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\gamma$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  oder  $\Delta$ Np63 $\beta$  transfiziert. Das Expressionsplasmid für  $\Delta$ Np63 $\beta$  wurde zuvor mittels ortsgerichteter Mutagenese aus dem Plasmid pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$  hergestellt (siehe Kapitel 4.2.7.2.1). Die Zellen wurden 24h p.t. geerntet und lysiert, gefolgt von einem dualen Luziferaseassay. Die Expression der p63-Isoformen wurde im WB mit Hilfe eines p63-spezifischen AK (Epitop AS 1-250 von  $\Delta$ Np63, entspricht AS 70-305 von TAp63) analysiert. Als Kontrolle wurde eine  $\beta$ -Actin-Färbung durchgeführt.

Betrachtet man in Abbildung 13 die TAp63-Isoformen, so sind diese in der Lage, in geringem Maße die CRT zu aktivieren (6-fach) und mit  $\beta$ -Catenin bei der Aktivierung der CRT zu kooperieren (11- bzw. 4-fach; 7- bzw. 2-fach). Es zeigt sich, dass TAp63 $\gamma$ , dem die SAM- und post-SAM-Domäne fehlt, ein stärkerer Aktivator der CRT ist als TA\*/TAp63 $\alpha$  (13-fach, 30-fach bzw. 10-fach).



**Abbildung 13: Untersuchung der Transkriptionsaktivierung eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotors durch verschiedene p63-Isoformen.**

1,0x10<sup>5</sup> H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng der Plasmide pcDNA3-TA\*p63 $\alpha$ , pcDNA3-TAp63 $\alpha$ , pRC-CMC-p51A (TAp63 $\gamma$ ), pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$ , pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\beta$ , 160ng pCIneo- $\beta$ -Catenin und 200ng pGL3-OT transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng pRL-*tk* versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luziferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle des Reporters dargestellt. Die Expression der verschiedenen p63-Isoformen wurde mittels WB nachgewiesen. Dargestellt sind zwei verschiedene Expositionen des Röntgenfilms, da TAp63 $\gamma$  sehr schnell abgebaut wird und dadurch schwer nachweisbar ist. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung wurde im Anschluss an die p63-Färbung nach dem Strippen der NC-Membran zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt.

Im Gegensatz zu den TAp63-Isoformen fehlt deren Antagonisten, den  $\Delta$ Np63-Isoformen, die N-terminale saure TAD ganz. Trotzdem sind bezogen auf die CRT gerade  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und  $\Delta$ Np63 $\beta$  starke Aktivator der Transkription.  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Expression führt zu einem Anstieg der

$\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven *Firefly*-Luziferaseaktivität auf das 27-fache, zusammen mit  $\beta$ -Catenin auf das 59-fache. Das entspricht einer Steigerung der durch  $\beta$ -Catenin-Synthese erfolgten CRT auf das 20-fache. Überraschenderweise ist in H1299-Zellen  $\Delta$ Np63 $\beta$  der stärkste Aktivator der CRT. Die Einzelexpression von  $\Delta$ Np63 $\beta$  verstärkt die  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsive *Firefly*-Luziferaseaktivität in H1299-Zellen 394-fach. Die Transaktivierung des Reporters scheint allerdings unabhängig von  $\beta$ -Catenin zu erfolgen, da die Koexpression beider Proteine zu keinem weiteren Anstieg der Luziferaseaktivität führt. Weiterhin haben Untersuchungen in 293-Zellen ergeben, dass in diesen Zellen die  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Isoform der deutlich stärkste Aktivator der CRT ist (Daten nicht gezeigt).

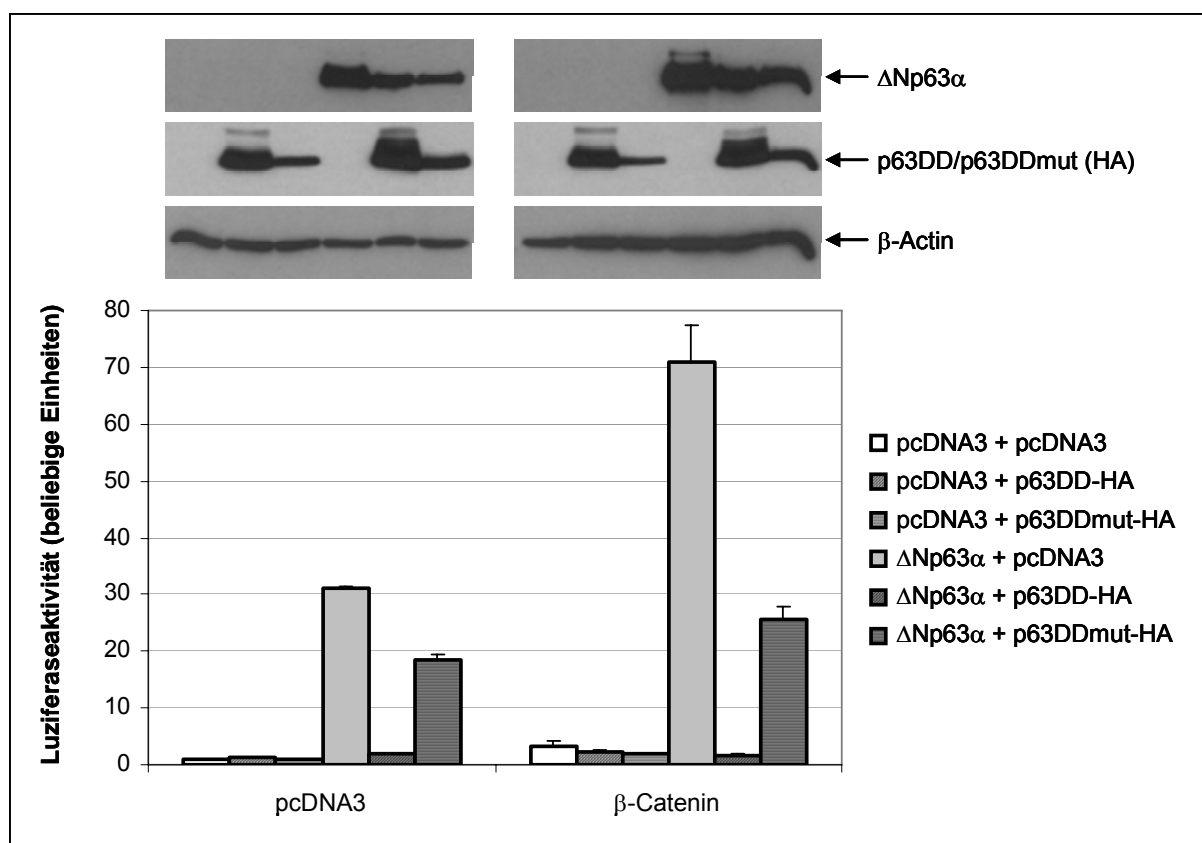
Zum Nachweis der Expression der verschiedenen p63-Isoformen wurde ein p63-spezifischer AK verwendet, der in der Lage ist, TAp63- und  $\Delta$ Np63-Isoformen zu detektieren. TA\*p63 $\alpha$  und TAp63 $\alpha$  werden etwa gleich stark exprimiert und unterscheiden sich nur gering in ihrem Laufverhalten. TAp63 $\gamma$  ist nur sehr schwer nachzuweisen, da es eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt (Calabro et al., 2002; Wu et al., 2005; Ying et al., 2005). Am stärksten wird  $\Delta$ Np63 $\alpha$  exprimiert. Neben den spezifischen Banden für TAp63 $\gamma$  und  $\Delta$ Np63 $\beta$  wurde jeweils noch eine schneller laufende Bande detektiert, bei der es sich um ein Abbauprodukt der Proteine handeln könnte. Anhand der  $\beta$ -Actin-Färbung ist zu erkennen, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die N-terminal trunkierten p63-Isoformen  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und  $\Delta$ Np63 $\beta$  starke Aktivatoren der CRT sind, während die TA-Isoformen dagegen eine schwächere Wirkung auf die CRT zeigen.

#### **5.1.4.2 Die Oligomerisierung von $\Delta$ Np63 $\alpha$ ist essentiell für die Aktivierung $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierter Transkription**

Vergleichbar mit p53 bindet p63 als Tetramer an responsive DNA-Elemente. Dabei interagieren vier p63-Moleküle über ihre OD miteinander. Da der Mechanismus der  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -vermittelten Aktivierung der CRT nicht hinreichend geklärt ist, haben wir uns die Frage gestellt, ob die Oligomerisierung von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  für die Aktivierung der CRT essentiell ist.

Um die Bedeutung der Oligomerisierung von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  für die Aktivierung der CRT zu untersuchen, wurde ein dualer  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiver Luziferaseassay durchgeführt. Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-OT, sowie mit verschiedenen Kombinationen von Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und p63DD-HA bzw. p63DDmut-HA transfiziert. p63DD-HA und p63DDmut-HA dienten in diesem Experiment als Werkzeuge zur Aufklärung der Bedeutung der Oligomerisierung.



**Abbildung 14: Untersuchung der Bedeutung der p63-Oligomerisierung bei der  $\Delta Np63\alpha$ -vermittelten  $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkriptionsaktivierung.**

$1,0 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng pcDNA3- $\Delta Np63\alpha$ , 400ng pcDNA3-p63DD-CHA, 400ng pcDNA3-p63DDmut-CHA, 160ng pCneo- $\beta$ -Catenin und 200ng pGL3-OT transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 40ng pRL-*tk* versehen und mit pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luziferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle des Reporters dargestellt. Die Expression von  $\Delta Np63\alpha$ , p63DD-CHA und p63DDmut-CHA wurde mittels WB nachgewiesen. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt. Dazu wurde die NC-Membran zuerst mit dem HA-AK gefärbt, gestrippt und anschließend mit AK gegen p63 und  $\beta$ -Actin nachgefärbt.

p63DD-HA besteht aus den AS 375 bis 680 von TA\*p63 $\alpha$  und einem C-terminalen HA-Epitop und umfasst damit dessen OD, SAM- und post-SAM-Domäne. Wie für p53 und p53DD, sowie p73 und p73DD bereits beschrieben, kann p63DD mit  $\Delta Np63\alpha$ -Monomeren interagieren und die Ausbildung von  $\Delta Np63\alpha$ -Homotetrameren unterbinden. Als Negativkontrolle diente p63DDmut-HA, das durch eine Punktmutation innerhalb der Oligomerisierungsdomäne, I378P, in Analogie zu p53 (L344P) (Davison et al., 1998; Lomax et al., 1998) und p73 (L371P) (Irwin et al., 2000; Kartasheva et al., 2002; Zaika et al., 2001) die Fähigkeit zur Oligomerisierung verloren hat. 24h p.t. wurden die Zellen geerntet und lysiert, gefolgt von einem dualen Luziferaseassay. Die Expression von  $\Delta Np63\alpha$  wurde mit Hilfe eines p63-spezifischen AK, die Expression von p63DD-CHA und p63DDmutCHA wurde

mit einem AK gegen das HA-Epitop analysiert. Als Ladekontrolle diente eine Färbung gegen  $\beta$ -Actin.

p63DD-CHA und p63DDmut-CHA allein haben keinen Einfluss auf die CRT (Abbildung 14). Während die Einzelexpression von  $\Delta Np63\alpha$  in H1299-Zellen zu einer gesteigerten Luziferaseaktivität (31-fach) führt, ist die zusätzliche Expression von p63DD-CHA in der Lage, die vorangegangene Aktivierung komplett zu unterbinden. Zwar führt die Koexpression von p63DDmut-CHA ebenfalls zu einer Abnahme der CRT (auf 58%), diese ist aber mit der des dominant negativen Inhibitors der Oligomerisierung nicht vergleichbar. Es ist möglich, dass die zusätzliche Fremdgenexpression die CRT negativ beeinträchtigt. Ein entsprechendes Ergebnis haben wir auch nach Koexpression von  $\beta$ -Catenin erhalten. Weder p63DD-CHA noch p63DDmut-CHA beeinflussen die  $\beta$ -Catenin-gesteuerte CRT.  $\Delta Np63\alpha$  steigert die  $\beta$ -Catenin-gesteuerte CRT um das 24-fache auf das 71-fache der Ausgangsaktivität. Hier wird besonders deutlich, dass die Inhibierung der Oligomerisierung von  $\Delta Np63\alpha$  durch p63DD-CHA die spezifische Aktivierung der CRT komplett verhindert. Auch in diesem Fall ist die zusätzliche Proteinexpression von p63DDmut-CHA von Nachteil, die CRT nimmt auf nur 37% ab. Dies wird auch deutlich, schaut man sich die Proteinexpression an. Obwohl anhand der  $\beta$ -Actin-Färbung zu erkennen ist, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden, geht die Expression von p63DD-CHA und p63DDmut-CHA mit einer leichten Abnahme von  $\Delta Np63\alpha$  einher. Die Abnahme von  $\Delta Np63\alpha$  ist jedoch so gering, dass damit die drastische Reduktion der Aktivierung der CRT durch p63DD-CHA nicht erklärt werden kann.

Die Oligomerisierung von  $\Delta Np63\alpha$  ist somit essentiell für die Aktivierung der CRT.

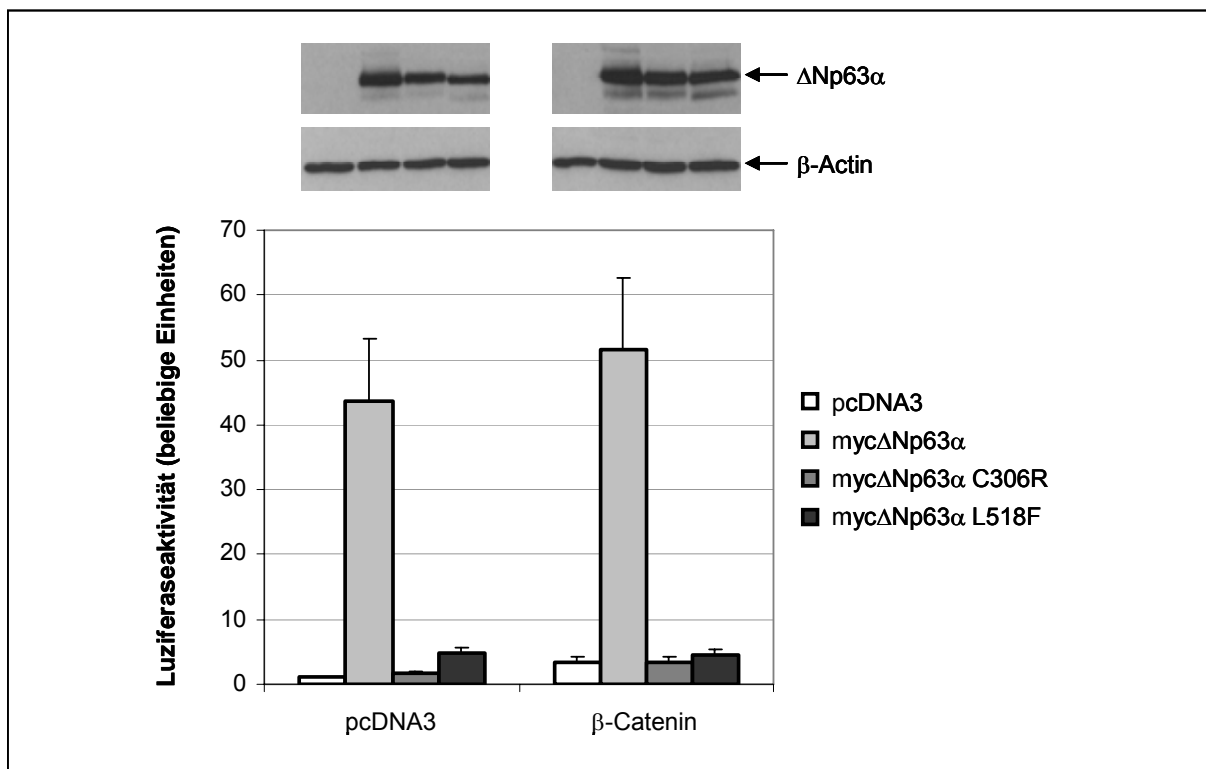
#### **5.1.5 Physiologisch relevante Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne und in der SAM-Domäne von $\Delta Np63\alpha$ beeinträchtigen die Aktivierung $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierter Transkription**

Bis zur heutigen Zeit wurden 5 ausgeprägte humane Fehlbildungssyndrome beschrieben, denen Mutationen im *p63*-Gen zuzuschreiben sind. Betrachtet man die bisher über diese *p63*-Mutationen gesammelten Daten, ist eine weitgehende Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erkennen. Dabei ist jedem Syndrom ein bestimmter Mutationstyp bzw. ein Mutationsmuster zuzuordnen (van Bokhoven et al., 2001). Das zuerst mit *p63*-Mutationen in Verbindung gebrachte Syndrom war das EEC-Syndrom (Rudiger et al., 1970), das mit einzelnen heterozygoten Missensmutationen einhergeht, die zu Aminosäuresubstitutionen innerhalb der DBD von p63 führen (Celli et al., 1999). Das Hay-Wells oder AEC-Syndrom wird

dagegen durch Missensmutationen innerhalb der SAM-Domäne hervorgerufen (McGrath et al., 2001).

Wir haben uns die Frage gestellt, welche Bedeutung EEC- und AEC-spezifische  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -Punktmutationen für die Aktivierung der CRT haben.

Um diese Frage zu beantworten, wurden subkonfluente H1299-Zellen mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-OT und mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin, myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$ , myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  C306R (EEC) (Celli et al., 1999) und myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  L518F (AEC) (McGrath et al., 2001) in verschiedenen Kombinationen transfiziert. 24h p.t. wurden die Zellen geerntet und lysiert, gefolgt von einem dualen Luziferaseassay. Die Proteinexpression von myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  und seinen Mutanten wurde im Vergleich zur Gesamtproteinmenge ( $\beta$ -Actin) mittels WB analysiert.



**Abbildung 15: Untersuchung der Funktion physiologisch relevanter p63-Mutanten bei der  $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkriptionsaktivierung.**

1,0x10<sup>5</sup> H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng der Plasmide pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$ , pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$  C306R, pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$  L518F, 160ng pCneo- $\beta$ -Catenin und 200ng pGL3-OT transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng pRL-*tk* versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luziferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle des Reporters dargestellt. Die Expression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und dessen Punktmutanten wurde mittels WB nachgewiesen. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt.

Während die Expression von myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  die endogene CRT 44-fach verstärkt, führt die Expression der EEC- und AEC-Mutanten von myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  nur zu einem geringen Anstieg der CRT (myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  C306R 2-fach, myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  L518F 5-fach) (Abbildung 15). Die myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  C306R EEC-Mutante ist gar nicht in der Lage, mit  $\beta$ -Catenin zu kooperieren. Auch die AEC-Mutante myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  L518F verstärkt die  $\beta$ -Catenin-getriebene CRT nur 1,4-fach. Myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  verstärkt die  $\beta$ -Catenin-vermittelte CRT dagegen 15-fach auf das 52-fache der endogenen CRT. Wie aus dem WB zu ersehen ist, wurden gleiche Gesamtproteinmengen der Lysate aufgetragen. Myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  und die Substitutionsmutanten myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  C306R und L518F unterscheiden sich leicht in ihrem Laufverhalten, werden aber gleich stark exprimiert.

Damit beeinträchtigen die physiologisch relevanten Punktmutanten myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  C306R in der DBD und myc- $\Delta$ Np63 $\alpha$  L518F in der SAM-Domäne deutlich die durch  $\Delta$ Np63 $\alpha$  vermittelte Aktivierung der CRT.

## 5.2 $\Delta$ Np63 $\alpha$ reguliert nicht die Phosphorylierung des Transkriptionskofaktors $\beta$ -Catenin

Nach den Untersuchungen zur Spezifität von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  für die Aktivierung der CRT und der Analyse der für diese Funktion notwendigen Proteindomänen haben wir uns die Frage gestellt, an welcher Stelle  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in den Wnt-Signalweg eingreift.

In Abwesenheit von Wnt-Signalproteinen unterliegt E-Cadherin-ungebundenes zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin einem schnellen Umsatz. Der Abbau von  $\beta$ -Catenin bedarf dabei der Aktivität der Proteine Axin, APC, GSK3- $\beta$ , CK-1, dem SCF-Komplexkomponenten  $\beta$ -TrCP und dem 26S Proteasom. Die Bindung und Komplexbildung von Axin, APC, CK-1 und GSK3- $\beta$  ermöglicht die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an verschiedenen Phosphorylierungsstellen. Zwei GSK3- $\beta$ -spezifische Phosphorylierungsstellen konstituieren dabei eine phosphorylierungsabhängige Bindungsstelle für  $\beta$ -TrCP, wodurch  $\beta$ -Catenin zuerst polyubiquitinyliert und später dem vollständigen proteosomalen Abbau zugeführt wird (Winston et al., 1999). Viele humane Tumoren weisen aktives  $\beta$ -Catenin auf. Die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin erfolgt dabei über dessen Stabilisierung. Verschiedene zytoplasmatische Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges, die am proteolytischen Abbau von  $\beta$ -Catenin beteiligt sind, können in Tumorzellen mit dominant aktivem  $\beta$ -Catenin dereguliert oder mutiert vorliegen. So wurden bisher Mutationen im APC-Gen, Hypermethylierung des *wt* APC-Allels, Mutationen im  $\beta$ -Catenin- oder Axin-Gen oder dem E3 Ubiquitin-Ligasen von  $\beta$ -Catenin,  $\beta$ TrCP, nachgewiesen (Behrens and Lustig, 2004). Für  $\Delta$ Np63 $\alpha$  wurde

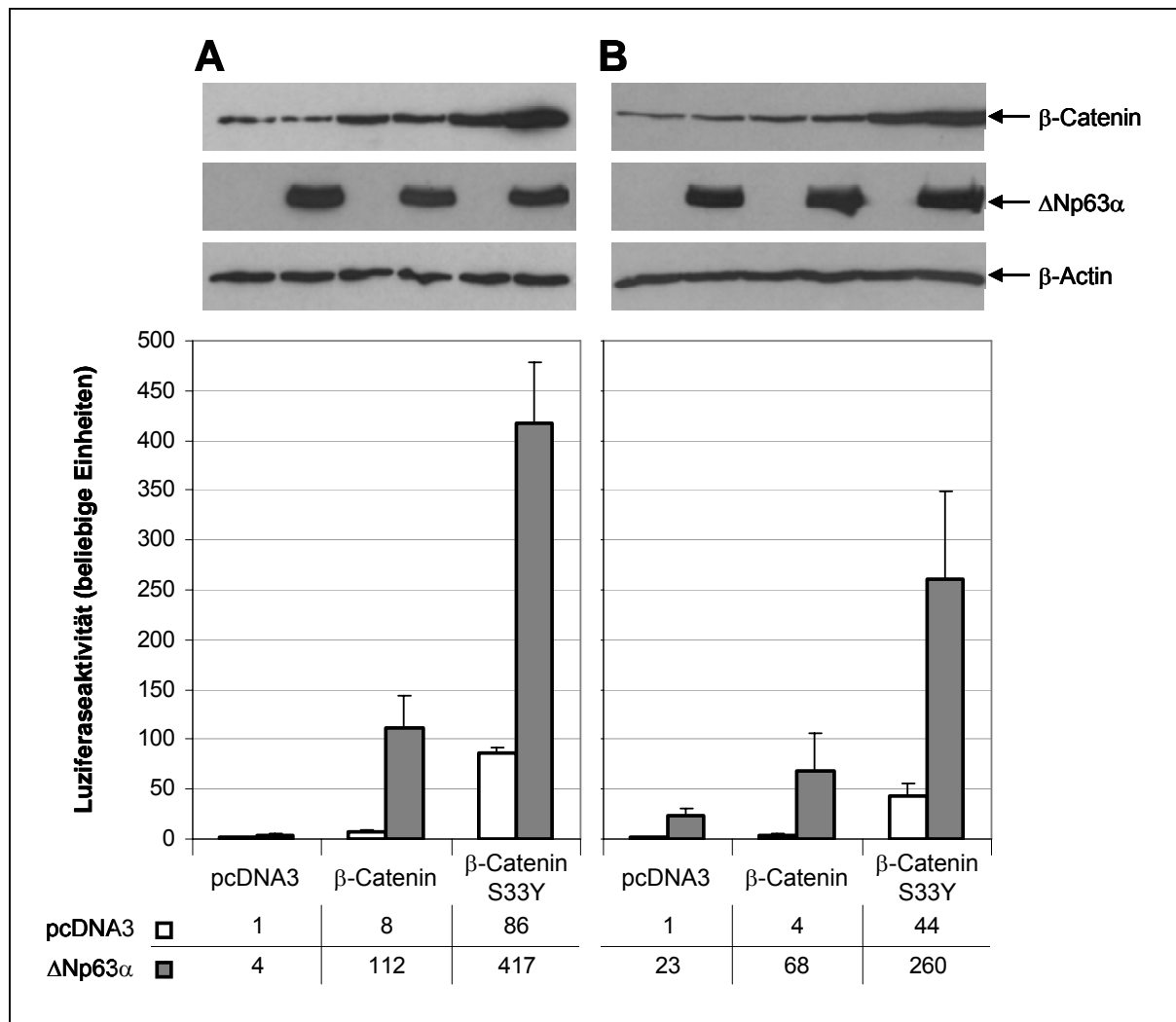
beschrieben, dass es die CRT durch die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin aktiviert (Patturajan et al., 2002). Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  auf die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin im Hinblick auf dessen Aktivität untersucht.

### 5.2.1 $\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt signifikant die Aktivität der konstitutiv aktiven Mutante $\beta$ -Catenin S33Y

Um die Frage zu beantworten, ob  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die CRT über die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin aktiviert, wurde ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Subkonfluente 293- und H1299-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-OT in verschiedenen Kombinationen mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin S33Y und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  transfiziert.  $\beta$ -Catenin S33Y ist eine dominant aktive tumorspezifische Mutante aus SW48-Zellen, deren Serin an Aminosäureposition 33 in ein Tyrosin mutiert ist (Morin et al., 1997). Die dadurch gestörte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin führt zu dessen Stabilisierung. 24h p.t. wurden die Zellen geerntet und lysiert, gefolgt von einem dualen Luziferaseassay. Anschließend wurden die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von  $\beta$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin S33Y,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und der Kontrolle  $\beta$ -Actin im WB analysiert.

Wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben, wird in 293-Zellen die *Firefly*-Luziferase durch transiente Überexpression von  $\beta$ -Catenin 8-fach verstärkt (Abbildung 16A).  $\Delta$ Np63 $\alpha$  alleine ist in der Lage, die CRT zu vervierfachen, gemeinsam mit  $\beta$ -Catenin steigt die Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Reporters auf das 112-fache an, d.h.,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  verstärkt die durch  $\beta$ -Catenin-Synthese hervorgerufene Aktivität noch einmal 14-fach. Die Expression der dominant aktiven  $\beta$ -Catenin S33Y Mutante führt im Vergleich zur endogenen Aktivität des Reporters zu einer 86-fachen Luziferaseaktivität. Diese ist 11-mal stärker als die durch  $\beta$ -Catenin Expression induzierte Luziferaseaktivität. Erstaunlicherweise ist  $\Delta$ Np63 $\alpha$  wiederum in der Lage, mit  $\beta$ -Catenin S33Y zu kooperieren, die Koexpression beider Proteine führt zu einem Anstieg der Luziferaseaktivität auf das 417-fache, das entspricht der 5-fachen durch  $\beta$ -Catenin S33Y Einzelexpression induzierten Aktivität. Vergleicht man die  $\beta$ -Catenin Proteinlevels, so steigen diese nach Transfektion der stabilen, dominant aktiven Mutante  $\beta$ -Catenin S33Y im Vergleich zum *wt*  $\beta$ -Catenin erwartungsgemäß deutlich an. Auch ist ein leichter Anstieg der  $\beta$ -Catenin-Levels nach Transfektion mit *wt*  $\beta$ -Catenin zu verzeichnen. Allerdings ist eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin, wie sie bei  $\beta$ -Catenin S33Y erkennbar ist, durch Koexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  nicht ersichtlich. Die in Abbildung 16A, Spur 6 auftretende etwas stärkere  $\beta$ -Catenin-Bande nach Koexpression von  $\beta$ -Catenin S33Y und  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , ist vermutlich auf die ungleichmäßige Färbung der NC-Membran zurückzuführen.





**Abbildung 16: Untersuchung der Funktion von  $\Delta Np63\alpha$  bei der Transkriptionsaktivierung eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotors in Anwesenheit einer konstitutiv aktiven und stabilen  $\beta$ -Catenin-Mutante.**

$7,5 \times 10^4$  293-Zellen (A) bzw.  $1,0 \times 10^5$  H1299-Zellen (B) wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng pcDNA3- $\Delta Np63\alpha$ , 160ng pCIneo- $\beta$ -Catenin, 160ng pCIneo- $\beta$ -Catenin S33Y und 200ng pGL3-OT transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng pRL-*tk* versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luciferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luciferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle des Reporters dargestellt. Die Expression von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta Np63\alpha$  wurde mittels WB untersucht. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt. Dazu wurde die Membran zuerst mit einem AK gegen  $\beta$ -Catenin gefärbt, gestrippt und anschließend mit einem AK gegen p63 und einem AK gegen  $\beta$ -Actin nachgefärbt.

In H1299-Zellen zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 16B). Die transiente Überexpression von  $\beta$ -Catenin transaktiviert den Tcf-responsiven Promotor 4-fach.  $\Delta Np63\alpha$  alleine führt zu einem 23-fachen Anstieg der Luciferaseaktivität, während die gemeinsame Überexpression von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta Np63\alpha$  die Aktivität des Reporters auf das 68-fache und damit auf das 17-fache der durch  $\beta$ -Catenin-induzierten Aktivität verstärkt.  $\beta$ -Catenin S33Y aktiviert die CRT des Reportergens auf das 44-fache der endogenen Aktivität. Das entspricht

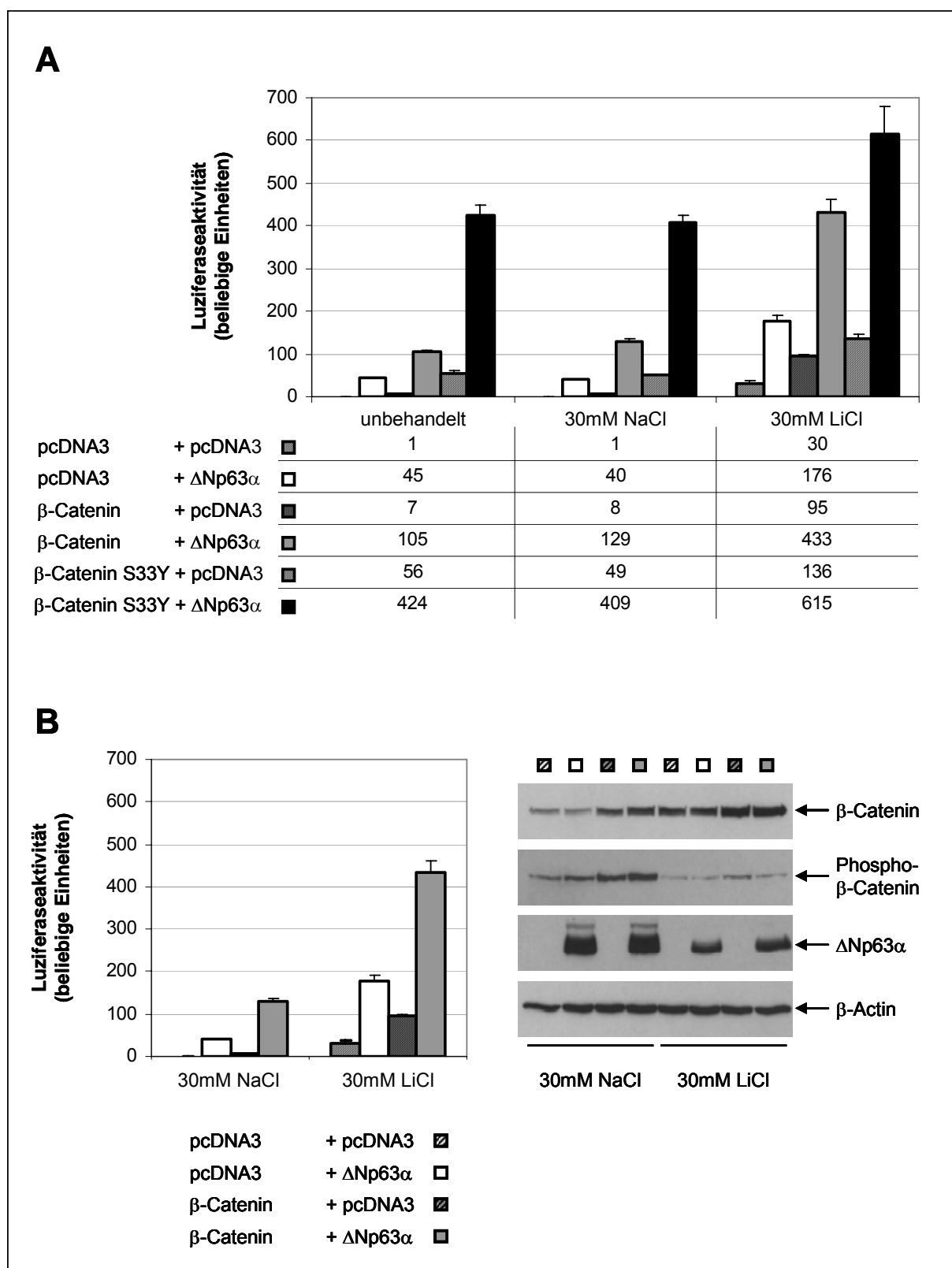
einer 10-fachen Aktivierung im Vergleich zu  $\beta$ -Catenin. Auch in H1299-Zellen ist  $\Delta\text{Np63}\alpha$  in der Lage, mit  $\beta$ -Catenin S33Y bei der Aktivierung der CRT zu kooperieren. Die Koexpression beider Proteine führt zum Anstieg der Luziferaseaktivität auf das 260-fache, das entspricht etwa der 6-fachen  $\beta$ -Catenin S33Y-induzierten Aktivität. Im WB ist die Expression der stabilen Mutante  $\beta$ -Catenin S33Y durch höhere Proteinlevels deutlich von der Expression endogenem  $\beta$ -Catenins und der Expression exogenem *wt*  $\beta$ -Catenins zu unterscheiden. Die Proteinlevels von endogenem und exogenem  $\beta$ -Catenin unterscheiden sich wie in Kapitel 5.1.1 beobachtet nur marginal. Die Koexpression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  führt keine Veränderungen der  $\beta$ -Catenin-Levels herbei.

$\Delta\text{Np63}\alpha$  ist in 293- und H1299-Zellen in der Lage, mit der stabilen, konstitutiv aktiven  $\beta$ -Catenin S33Y-Mutante bei der Transaktivierung der CRT zu kooperieren. Dies führt zu einem deutlichen Anstieg der  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Luziferaseaktivität. Im Widerspruch zu Patturajan *et al.* ist  $\Delta\text{Np63}\alpha$  nicht in der Lage, die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zu beeinflussen (Patturajan *et al.*, 2002).

### **5.2.2 Im Gegensatz zur Inhibierung der GSK3- $\beta$ -Aktivität führt die $\Delta\text{Np63}\alpha$ -Expression nicht zu einer Akkumulation von $\beta$ -Catenin**

Nachdem kein Einfluss von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  auf die Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden konnte, haben wir den Einfluss von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  auf die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin untersucht. Eine bedeutende Rolle bei der Phosphorylierung und der damit verbundenen Destabilisierung von  $\beta$ -Catenin spielt GSK3- $\beta$ .

Im folgenden Versuch wurde die Aktivität von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  bei der CRT in unbehandelten, NaCl-behandelten und LiCl-behandelten H1299-Zellen untersucht. LiCl ist ein spezifischer Inhibitor der GSK3- $\beta$  und ist in der Lage, Wnt-Signaltransduktion nachzuahmen (Klein and Melton, 1996; Stambolic *et al.*, 1996). Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-OT, sowie mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin S33Y und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  in verschiedenen Kombinationen transfiziert. 6h p.t. wurde bei einem Drittel des Ansatzes ein normaler Mediumwechsel vorgenommen. Bei einem weiteren Drittel des Ansatzes wurde dem frischen Medium 30mM NaCl zugesetzt, der restliche Ansatz wurde entsprechend mit 30mM LiCl behandelt. 24h p.t., 18h nach dem Mediumwechsel, wurden die Zellen geerntet und lysiert, gefolgt von einem dualen Luziferaseassay. Die Expression von  $\beta$ -Catenin, Phospho- $\beta$ -Catenin und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  wurde anschließend mittels WB untersucht. Als Kontrolle für gleiche Gesamtproteinmengen diente eine  $\beta$ -Actin-Färbung.



**Abbildung 17: Einfluss des GSK3-β-Inhibitors LiCl auf die ΔNp63α-vermittelte Aktivierung eines β-Catenin-Tcf-responsiven Promotors.**

**A:**  $1,0 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng pcDNA3-ΔNp63α, 160ng pCIneo-β-Catenin, 160ng pCIneo-β-Catenin S33Y und 200ng pGL3-OT transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng pRL-tk versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. 6h p.t. wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Während ein Teil der Zellen unbehandelt gelassen wurde, wurden Parallelansätze mit 30mM NaCl oder 30 mM LiCl behandelt. Wie in

Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luziferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind relativ zur Aktivität der unbehandelten Vektorkontrolle des Reporters dargestellt. **B:** Die Lysate der im linken Diagramm dargestellten Proben wurden mittels WB untersucht. Dabei wurde die Expression der Proteine  $\beta$ -Catenin, Phospho- $\beta$ -Catenin (Ser33/37/Thr41) und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  mit spezifischen AK analysiert. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt. Die NC-Membran wurde zuerst mit dem Phospho- $\beta$ -Catenin-AK gefärbt, gestrippt, mit dem  $\beta$ -Catenin-AK gefärbt, gestrippt und anschließend mit AK gegen p63 und  $\beta$ -Actin nachgefärbt.

Unbehandelte und NaCl-behandelte Kontrollansätze weisen vergleichbare Ergebnisse auf (Abbildung 17A).  $\Delta$ Np63 $\alpha$  aktiviert die CRT in den Kontrollzellen etwa 40-45-fach.  $\beta$ -Catenin-Expression induziert die CRT 7-8-fach. Die Koexpression von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  führt zu einer 105-129-fachen Luziferaseaktivität und verstärkt damit die durch die Expression von  $\beta$ -Catenin vermittelte Aktivität 15-16-fach.  $\beta$ -Catenin S33Y aktiviert die CRT 49-56-fach, zusammen mit  $\Delta$ Np63 $\alpha$  409-424-fach, d.h.,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  verstärkt die  $\beta$ -Catenin S33Y-vermittelte Transkription noch einmal 8-fach. Vergleicht man diese Luziferaseaktivitäten mit den in Abbildung 16B dargestellten Aktivitäten, so sind sie etwa doppelt so stark. Dies resultiert aus der Versuchsdurchführung nach der Transfektion der Zellen mit Lipofectamine™ 2000 (4.1.2.3). Normalerweise wurde nach der Transfektion der Zellen auf einen Mediumwechsel verzichtet. Bei diesem Experiment wurde 6h p.t. ein Mediumwechsel vorgenommen, um die Zellen entsprechend zu behandeln. Es konnte beobachtet werden, dass sich ein Mediumwechsel 6h p.t. positiv auf den Gesamtzustand und die Lebensfähigkeit der Zellen auswirkt. Die Behandlung der Zellen mit LiCl aktiviert wie erwartet die CRT und führt zu einem Anstieg der Luziferaseaktivitäten. Die endogene Luziferaseaktivität steigt auf das 30-fache.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ist auch nach Inhibierung der GSK3- $\beta$  in der Lage, die CRT zu verstärken. Einzeln exprimiertes  $\Delta$ Np63 $\alpha$  verstärkt die Luziferaseaktivität in LiCl-behandelten Zellen auf das 176-fache.  $\beta$ -Catenin Expression führt zu einer 95-fachen Luziferaseaktivität. Wiederum können  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  kooperieren. Zusammen aktivieren sie die CRT 433-fach, d.h.,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  verstärkt die durch  $\beta$ -Catenin Expression induzierte CRT 5-fach. Auch die konstitutiv aktive Mutante  $\beta$ -Catenin S33Y aktiviert die CRT nach LiCl-Behandlung 3-fach, und zwar 136-fach.  $\beta$ -Catenin S33Y und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  zusammen aktivieren die CRT 615-fach, das entspricht einer 5-fachen Verstärkung der durch  $\beta$ -Catenin S33Y induzierten CRT.

Um die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin in Abhängigkeit von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Expression und LiCl-Behandlung zu untersuchen, wurde ein Teil der Lysate im WB analysiert (Abbildung 17B). Betrachtet man die  $\beta$ -Catenin-Levels in NaCl-behandelten Zellen, so erkennt man eine Zunahme von  $\beta$ -Catenin nach Transfektion mit einem  $\beta$ -Catenin Expressionsplasmid. Dies konnte in Abbildung 16B nicht dargestellt werden. Die Ursache dafür liegt vermutlich in dem fehlenden Mediumwechsel nach der Transfektion mit Lipofectamine™ 2000. Die Behandlung der Zellen mit LiCl führt sowohl zur Akkumulation von endogenem als auch von exogenem  $\beta$ -

Catenin. Während in NaCl-behandelten Zellen  $\beta$ -Catenin deutlich phosphoryliert ist, führt die Behandlung der Zellen mit LiCl zu einer starken Abnahme der Phosphorylierung. Im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit LiCl ändert die Expression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  nichts an der Phosphorylierung und an der Stabilität von  $\beta$ -Catenin. In LiCl-behandelten Zellen ist die Expression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  etwas abgeschwächt. Dies liegt wahrscheinlich an der LiCl-Behandlung selbst, die sich negativ auf die Fremdgenexpression auswirkt. Anhand der  $\beta$ -Actin-Färbung ist zu erkennen, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  die CRT spezifisch aktiviert, ohne die Phosphorylierung und damit die Stabilität von  $\beta$ -Catenin zu beeinflussen. Auch wenn ein aktiver Wnt-Signalweg durch die Behandlung von Zellen mit LiCl induziert wird, kann  $\Delta\text{Np63}\alpha$  noch die CRT verstärken.

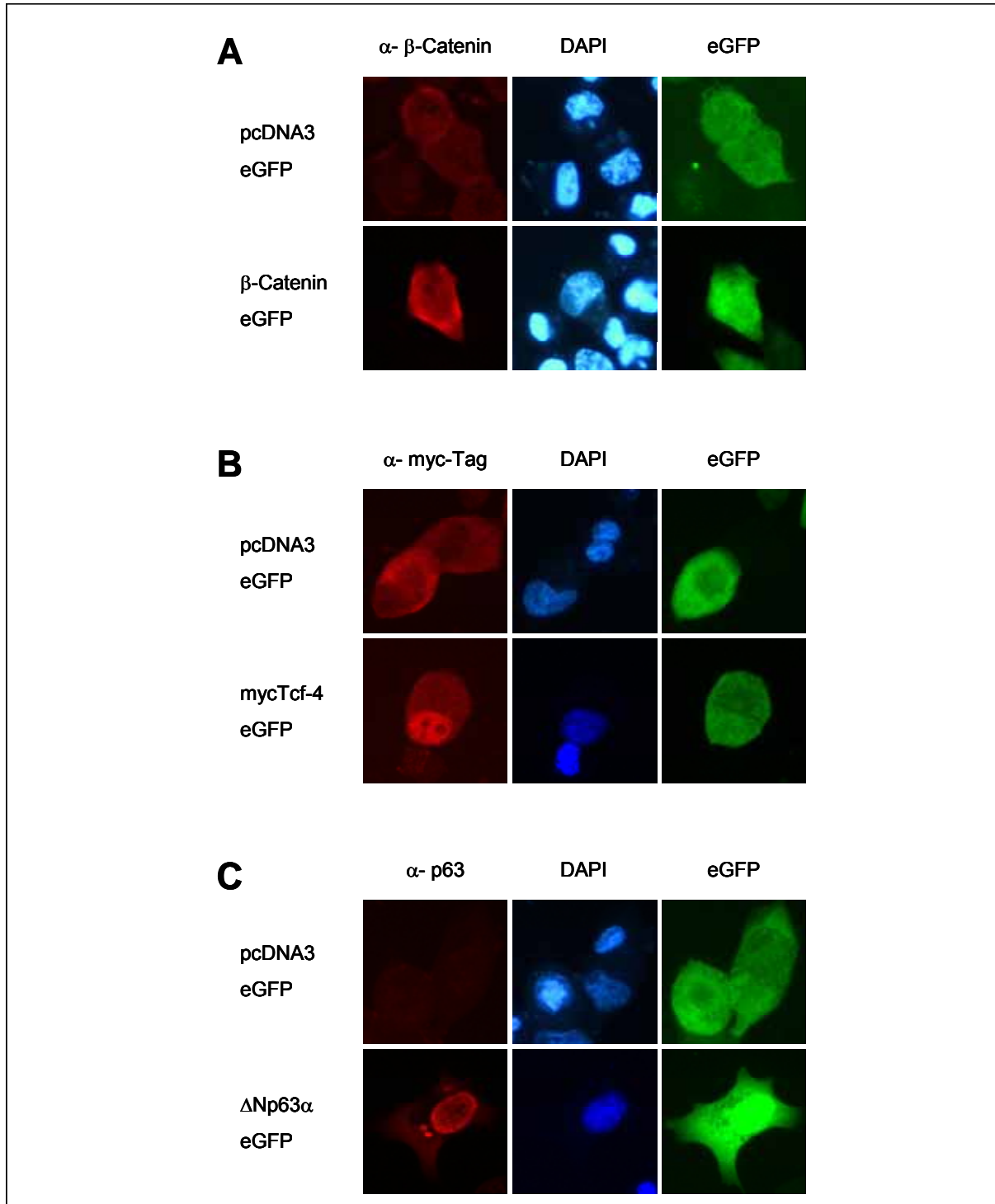
### **5.3 In Abhängigkeit von Tcf-4 beeinflusst $\Delta\text{Np63}\alpha$ die intrazelluläre Lokalisation von $\beta$ -Catenin**

Da gezeigt werden konnte, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  die CRT spezifisch verstärkt, es aber die Phosphorylierung und damit die Proteinstabilität von  $\beta$ -Catenin unbeeinflusst lässt, haben wir uns der intrazellulären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  zugewandt.

#### **5.3.1 Die intrazelluläre Lokalisation von $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta\text{Np63}\alpha$**

In Abwesenheit der Wnt-Signaltransduktion findet man  $\beta$ -Catenin in einem stabilen Komplex mit E-Cadherin an der Zellmembran (McCrea and Gumbiner, 1991; McCrea et al., 1991). Ungebundenes zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin unterliegt dagegen dem ständigen proteolytischen Abbau (Kapitel 5.2). Während der Wnt-Signaltransduktion akkumuliert freies  $\beta$ -Catenin und wird nach Assoziation mit verschiedenen zytoplasmatischen und nukleären Bindungspartnern im Zytoplasma und im Zellkern verteilt (Tolwinski and Wieschaus, 2001). Im Zellkern aktiviert  $\beta$ -Catenin als Kofaktor von Tcf/Lef Wnt-regulierte Gene (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996; van de Wetering et al., 1997). Tcf-4 ist ein Mitglied der Tcf/Lef-Familie von Transkriptionsfaktoren. Im Allgemeinen handelt es sich bei diesen Proteinen nicht um klassische Transkriptionsfaktoren, da die DNA-Bindung allein nicht ausreichend ist, die Transkription von Zielgenen zu aktivieren. Im Zellkern kann Tcf-4 mit Repressoren, z.B. Groucho, oder Aktivatoren, z.B.  $\beta$ -Catenin, der Tcf-regulierten Transkription im Komplex vorliegen (Brantjes et al., 2002). In Immunolokalisationsassays humaner Gewebeschnitte

wurde mit dem monoklonalen p63-AK 4A4 eine starke nukleäre Färbung in basalen Zellen des Epitheliums beobachtet (Yang et al., 1998). Um den Einfluss von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  auf die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und Tcf-4 zu untersuchen, wurde zunächst die Lokalisation der Proteine nach Einzelexpression in H1299-Zellen analysiert.



**Abbildung 18: Intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta\text{Np63}\alpha$ .**

$5,0 \times 10^4$  H1299-Zellen wurden mit leerem Vektor, 340ng pcDNA3- $\Delta\text{Np63}\alpha$ , 137ng pCIneo- $\beta$ -Catenin bzw. 54ng pcDNA3-myc-Tcf-4 transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden zur späteren Transfektionskontrolle mit 25ng pCMV-eGFP versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 568ng

aufgefüllt. 24h p.t. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit spezifischen AK inkubiert und mit einem AlexaFluor®594-gekoppelten Zweitantikörper markiert.

Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit dem leeren Vektor pcDNA3 und dem Plasmid pCMV-eGFP bzw. mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 oder  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und eGFP transfiziert. Die Transfektion mit pCMV-eGFP diente dabei als Transfektionskontrolle. Im Folgenden wurden nur eGFP-exprimierende und damit transfizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden 24h p.t. fixiert und permeabilisiert.  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  wurden mit spezifischen AK, myc-Tcf4 wurde mit einem AK gegen das myc-Epitop detektiert und diese wurden wiederum mit einem AlexaFluor®594-gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Zur Unterscheidung von Zellkern und Zytoplasma wurde die DNA der Zellen mittels DAPI gefärbt (4.3.4).

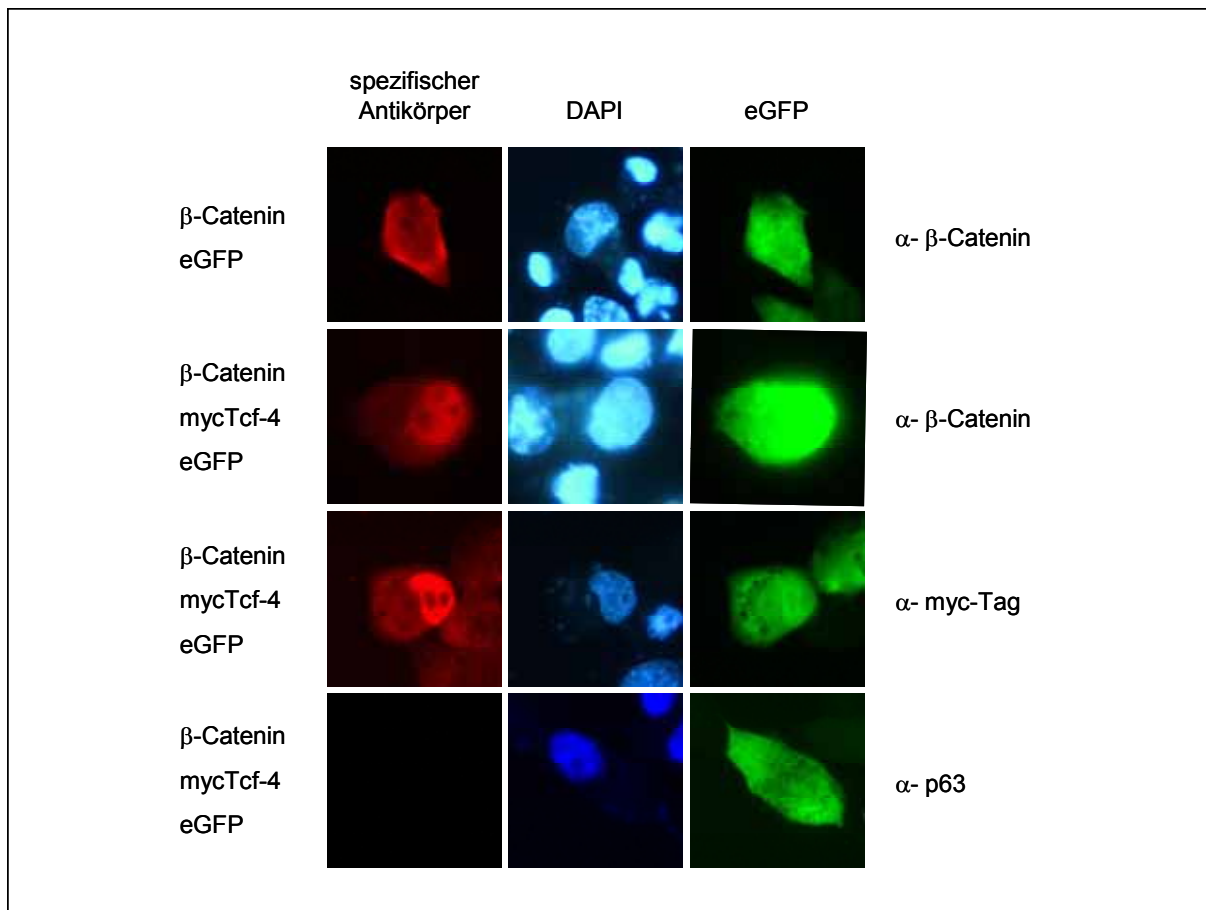
Endogenes  $\beta$ -Catenin liegt in H1299-Zellen in geringen Mengen homogen im Zytoplasma verteilt vor, während es an der Zellperipherie leicht akkumuliert. Eine nukleäre  $\beta$ -Catenin-Färbung ist nicht nachweisbar. Die zusätzliche Expression von  $\beta$ -Catenin führt zu einem Anstieg der  $\beta$ -Catenin-Levels. Die intrazelluläre Verteilung von  $\beta$ -Catenin ändert sich dadurch nicht (Abbildung 18A).

In untransfizierten H1299-Zellen geht der AK gegen das myc-Epitop starke unspezifische Bindungen ein. Dies äußert sich in einer diffusen Färbung der gesamten Zelle. Dagegen zeigen myc-Tcf-4-exprimierende Zellen eine deutliche Kernfluoreszenz. Myc-Tcf-4 ist im Zellkern lokalisiert, wobei distinkte kreisrunde Bereiche, bei denen es sich um die Nukleoli handeln könnte, ausgespart bleiben (Abbildung 18B).

H1299-Zellen exprimieren endogen kaum p63. Nach Expression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ist dies diffus im Zellkern verteilt nachweisbar (Abbildung 18C).

### **5.3.2 Die Expression von Tcf-4 führt zur Relokalisation von zytoplasmatischem $\beta$ -Catenin in den Zellkern**

Nach der Analyse der intrazellulären Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und myc-Tcf-4 nach Einzelexpression wurden beide Proteine koexprimiert. Dazu wurden subkonfluente H1299-Zellen mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin und eGFP bzw. für  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 und eGFP transfiziert. Die Immunfluoreszenzanalyse wurde wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben durchgeführt. Da die verwendeten Erstantikörper gegen  $\beta$ -Catenin und das myc-Epitop beide aus der Spezies Maus isoliert wurden, konnte keine Doppelimmunfluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt werden. Aus diesem Grund diente die Expression von eGFP als Kontrolle für erfolgreich transfizierte Zellen.



**Abbildung 19: Immunfluoreszenzanalyse der Koexpression von β-Catenin und Tcf-4.**

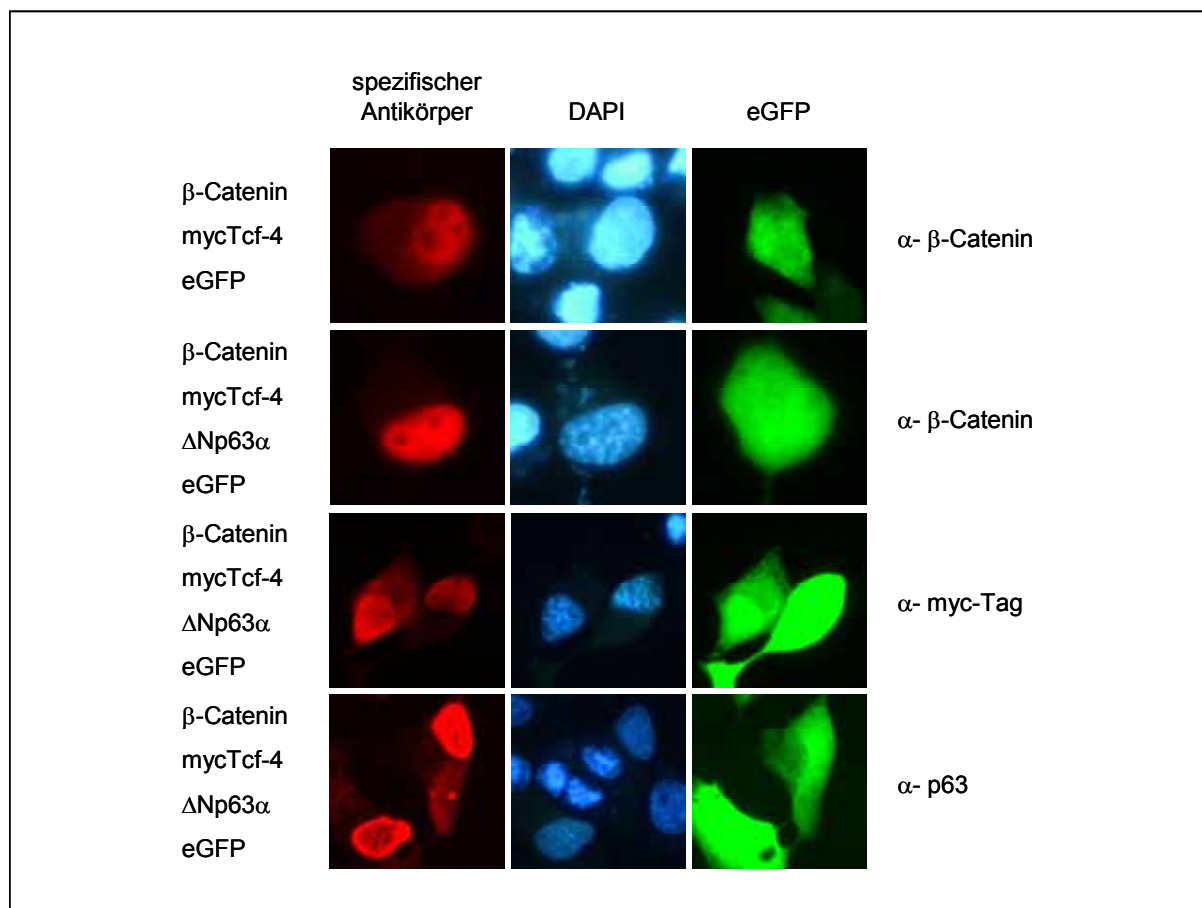
5,0x10<sup>4</sup> H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 137ng pCIneo-β-Catenin und 54ng pcDNA3-myc-Tcf-4 transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden zur späteren Transfektionskontrolle mit 25ng pCMV-eGFP versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 568ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 18 beschrieben, wurde 24h p.t. eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Wie in Kapitel 5.3.1 untersucht, führt die Einzelexpression von β-Catenin in H1299-Zellen zu einer zytoplasmatischen Verteilung der Proteine (Abbildung 19). Während keine Kernfluoreszenz nachweisbar ist, akkumuliert β-Catenin an der Zellmembran. Nach Koexpression des nukleären Proteins myc-Tcf-4, ist eine Relokalisation von β-Catenin in den Zellkern zu beobachten. Die für die Lokalisation von myc-Tcf-4 typischen Aussparungen, die vermutlich den Nukleoli entsprechen, sind ebenfalls bei dem nukleär lokalisierten β-Catenin zu beobachten. Neben der Lokalisation im Zellkern liegt β-Catenin homogen im Zytoplasma der Zelle verteilt vor. Eine Akkumulation von β-Catenin an der Zellperipherie ist nicht mehr erkennbar. Die Lokalisation von myc-Tcf-4 wird durch die Koexpression mit exogenem β-Catenin nicht beeinflusst.



Die Koexpression von  $\beta$ -Catenin und myc-Tcf-4 führt somit zur Relokalisation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Dies könnte auf der Kolokalisation beider Proteine, die einen zweiteiligen Transkriptionsfaktor darstellen, beruhen.

### 5.3.3 $\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt die Tcf-4-vermittelte Relokalisation von $\beta$ -Catenin



**Abbildung 20: Immunfluoreszenzanalyse der Koexpression von  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$ .**

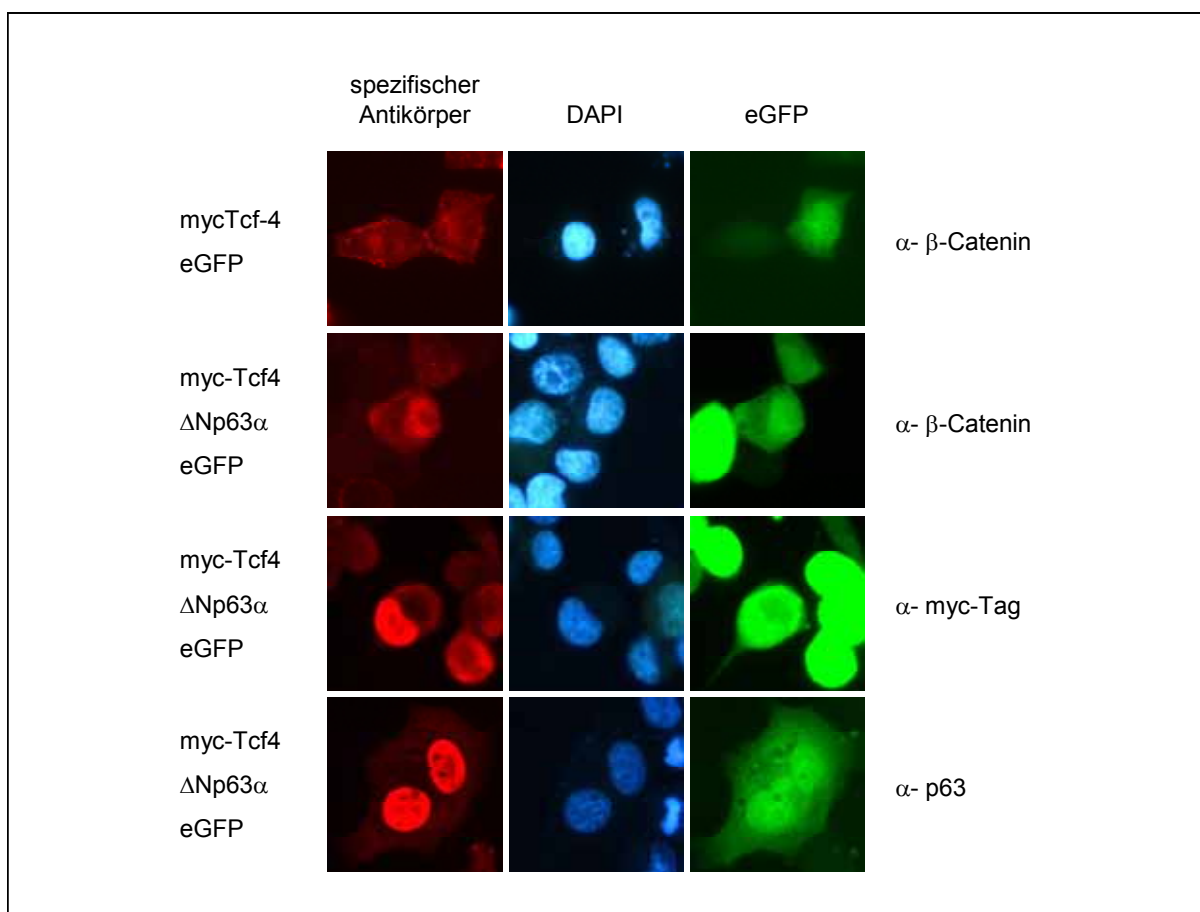
5,0x10<sup>4</sup> H1299-Zellen wurden mit leerem Vektor bzw. 340ng pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$  sowie 137ng pCIneo- $\beta$ -Catenin und 54ng pcDNA3-myc-Tcf-4 transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden zur späteren Kontrolle mit 25ng pCMV-eGFP versehen und mit pcDNA3 auf 568ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 18 beschrieben, wurde 24h p.t. eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Um die Frage zu beantworten, welchen Einfluss die Expression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  auf die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin bzw. den  $\beta$ -Catenin-Tcf-4-Komplex hat, wurden subkonfluente H1299-Zellen mit Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 und eGFP bzw. für  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und eGFP transfiziert. Die Immunfluoreszenzanalyse wurde wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben durchgeführt.

Die Koexpression von  $\beta$ -Catenin und myc-Tcf-4 führt zur Relokalisation von moderaten Mengen an  $\beta$ -Catenin (Abbildung 20). Wird zusätzlich  $\Delta$ Np63 $\alpha$  exprimiert, nimmt die Menge

an nukleärem  $\beta$ -Catenin deutlich zu, während nur noch eine sehr schwache zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Färbung detektierbar ist.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  verändert dabei nicht den Phänotyp der durch myc-Tcf-4 herbeigeführten Relokalisation von  $\beta$ -Catenin. Die Koexpression von  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$ .

Dies wirft die Frage auf, welchen Einfluss die Expression von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  auf die Lokalisation von endogenem  $\beta$ -Catenin ausübt. Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für myc-Tcf-4 und eGFP bzw. für myc-Tcf-4,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und eGFP transfiziert. Die Immunfluoreszenzanalyse wurde wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 21: Immunfluoreszenzanalyse der Koexpression von Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$ .**

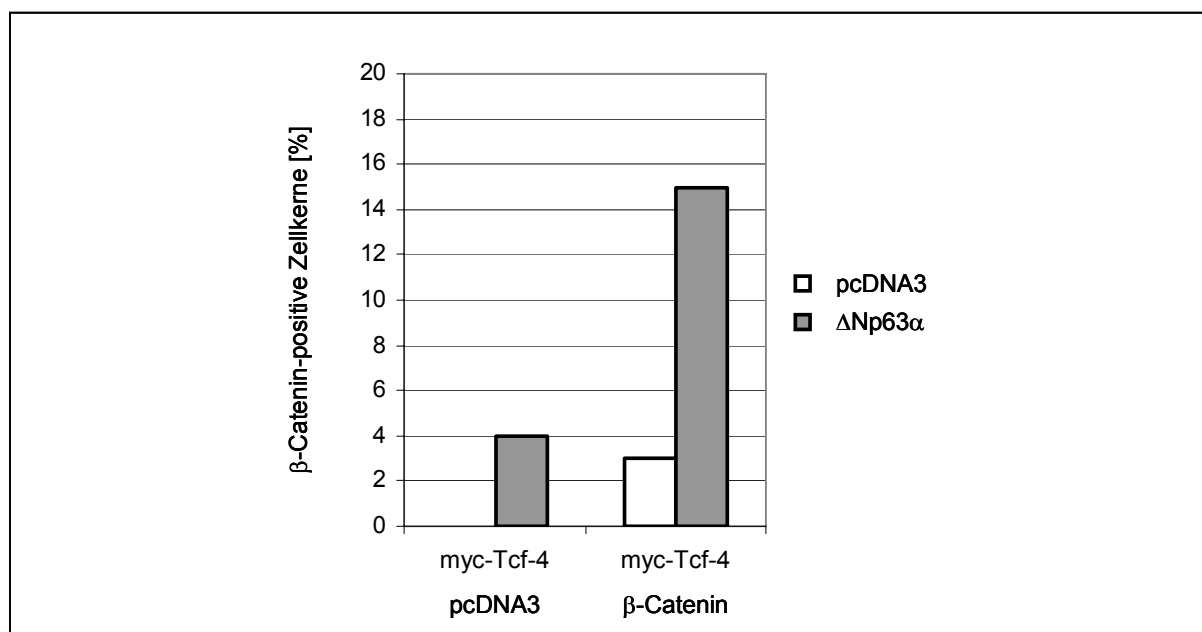
$5,0 \times 10^4$  H1299-Zellen wurden mit leerem Vektor bzw. 340ng pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$  und 54ng pcDNA3-myc-Tcf-4 transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden zur späteren Kontrolle mit 25ng pCMV-eGFP versehen und mit pcDNA3 auf 568ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 18 beschrieben, wurde 24h p.t. eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Endogenes  $\beta$ -Catenin ist in H1299-Zellen durch eine schwache homogene zytoplasmatische Färbung und eine deutliche Färbung der Zellperipherie gekennzeichnet (Abbildung 18A). Die

Einzelexpression von myc-Tcf-4 führt im Vergleich zu exogen exprimiertem  $\beta$ -Catenin und myc-Tcf-4 (Abbildung 19, Reihe 1) nicht zur Relokalisation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern (Abbildung 21, Reihe 1). Die Lokalisation von endogenem  $\beta$ -Catenin wird durch myc-Tcf-4 nicht verändert. Die Koexpression von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ist dagegen in der Lage, endogenes  $\beta$ -Catenin in den Zellkern zu relokalisieren (Abbildung 21, Reihe 2). Neben nukleär lokalisiertem  $\beta$ -Catenin findet man in den kotransfizierten Zellen zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin, das sich tendenziell an der Zellmembran ansammelt.

Fasst man die Ergebnisse der in den Abbildungen 19-21 gezeigten Experimente im Hinblick auf den Nachweis  $\beta$ -Catenin-positiver Zellkerne zusammen, ergibt sich das in Abbildung 22 dargestellte Diagramm.

Im Anschluss an die Immunfluoreszenzanalysen wurden in einer Blindstudie eGFP-exprimierende Zellen ausgezählt und als produktiv transfizierte Zellen definiert (Gesamtzellzahl, 100%). Danach wurde die Anzahl der eGFP-exprimierenden Zellen mit  $\beta$ -Catenin-positiven Zellkernen bestimmt und prozentual zur Gesamtzellzahl grafisch dargestellt.



**Abbildung 22: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzanalysen von  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$ .**

Die Anzahl der  $\beta$ -Catenin-positiven Zellkerne in Abhängigkeit von exogen exprimiertem  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (s. Abb. 19-21) wurde durch Auszählen bestimmt und grafisch dargestellt.

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, ist die Expression von myc-Tcf-4 notwendig, um zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin in den Zellkern zu relokalisieren. Es ist allerdings nicht ausreichend, um eine nukleäre Färbung endogener  $\beta$ -Catenin-Levels zu erreichen.  $\Delta$ Np63 $\alpha$

verstärkt die myc-Tcf-4-abhängige Relokalisation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Dies zeigt sich einerseits durch eine intensivere  $\beta$ -Catenin-spezifische Kernfluoreszenz (Abbildung 20), andererseits durch die Zunahme der Anzahl  $\beta$ -Catenin-positiver Zellkerne (5-fach, Abbildung 22). Besonders deutlich wird der Einfluss von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  bei der Relokalisation endogenen  $\beta$ -Catenins in den Zellkern. Nur die Koexpression von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ermöglicht den Nachweis  $\beta$ -Catenin-positiver Zellkerne in H1299-Zellen. Insgesamt ist der Anteil von Zellen mit nukleär lokalisiertem  $\beta$ -Catenin gering (3-15%). Dies könnte an der Versuchsdurchführung und der Expression von bis zu vier verschiedenen Fremdproteinen liegen. Die in den Abbildungen 19-21 durchgeführten Immunfluoreszenzen entstanden nach Lipofectamine™ 2000-Transfektion von subkonfluenten H1299-Zellen mit zwei bis vier verschiedenen Expressionsplasmiden. Wie bereits in Absatz 5.2.2 ausgeführt, wirkt sich die Transfektion mit diesem Reagenz negativ auf die Lebensfähigkeit der Zellen aus. Lipofectamine™ 2000 wurde verwendet, da es bei der Kotransfektion mehrerer Expressionsplasmide gute Transfektionseffizienzen erzielt.

Die gleichzeitige Färbung von  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in den Zellen war aufgrund der verwendeten AK nicht durchführbar, würde aber genauere Ergebnisse herbeiführen.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die Expression von myc-Tcf-4 für die Relokalisation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern notwendig ist. Desweiteren verstärkt  $\Delta$ Np63 $\alpha$  diesen Vorgang in Abhängigkeit von myc-Tcf-4.

#### **5.4 Der Komplex aus $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt die Aktivierung der $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkription**

Aus den Immunfluorezenzanalysen ging deutlich hervor, dass die Überexpression von myc-Tcf-4 bzw. von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  nötig ist, um exogene bzw. endogene  $\beta$ -Catenin-Level im Zellkern zu detektieren. Daraus ergibt sich die Frage, ob die zusätzliche Überexpression von myc-Tcf-4 die CRT in H1299-Zellen weiter verstärken kann und welche Funktion  $\Delta$ Np63 $\alpha$  dabei übernimmt.

##### **5.4.1 Die $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierte Transkription wird durch die Koexpression der Proteine $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta$ Np63 $\alpha$ verstärkt**

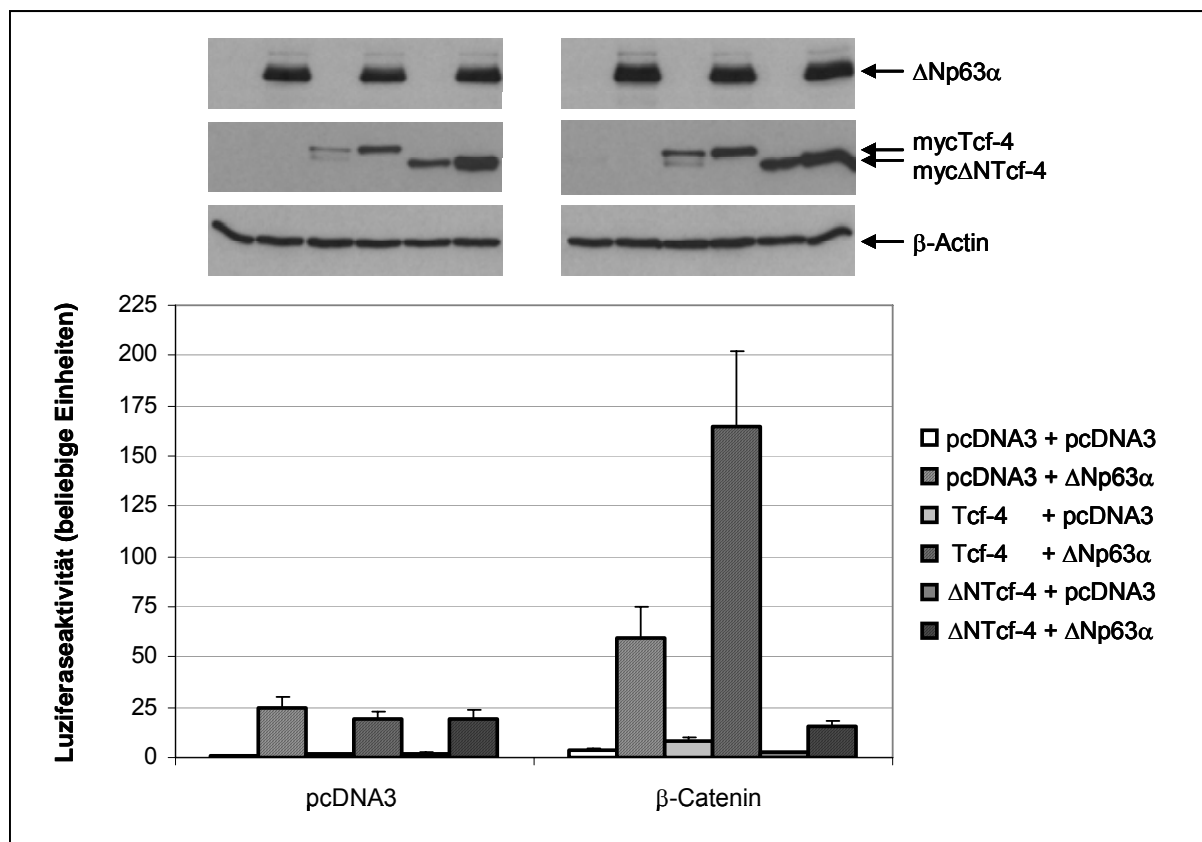
Um diese Frage zu beantworten, wurden subkonfluente H1299-Zellen mit den Reporterplasmiden pRL-*tk* und pGL3-OT und Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4, myc- $\Delta$ NTcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Dem N-terminal

trunkierten myc- $\Delta$ NTcf-4 fehlen im Vergleich zu *wt* Tcf-4 die ersten 30 AS (Korinek et al., 1997). Der N-Terminus der Tcf/Lef-Faktoren ist konserviert und vermittelt, wie für das humane Tcf-1, das murine Lef-1, das *Xenopus* Tcf-3 und das humane Tcf-4 beschrieben (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Korinek et al., 1997; Molenaar et al., 1996), die Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren und  $\beta$ -Catenin. Myc- $\Delta$ NTcf-4 ist somit eine dominant negative Deletionsmutante von Tcf-4, die die Aktivierung der CRT unterdrückt. 24h p.t. wurden die Zellen geerntet und lysiert, gefolgt von einem dualen Luziferaseassay. Die Expression von myc-Tcf-4, myc- $\Delta$ NTcf-4,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und  $\beta$ -Actin wurde im Anschluss im WB analysiert.

Die Einzelexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  verstärkt die Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Reporters 25-fach (Abbildung 23). Die myc-Tcf-4-Expression verdoppelt die endogene CRT. Obwohl wir mittels Immunfluoreszenzanalyse zeigen konnten, dass die Koexpression von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  endogenes  $\beta$ -Catenin in den Zellkern relokalisiert (Abbildung 21), scheint das in unserem Reporterassaysystem keinen funktionellen Einfluss auf die CRT zu haben. Nach Koexpression von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  steigt die Aktivität des Reporters nur auf das 19-fache an und liegt damit unter der Aktivität, die durch die Einzelexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  erzielt wird. Interessanterweise beeinflusst die dominant negative Mutante myc- $\Delta$ NTcf-4 die CRT in Abwesenheit von exogenem  $\beta$ -Catenin nicht negativ. Nach Einzelexpression kommt es wie bei der myc-Tcf-4-Expression zu einer Verdopplung der endogenen CRT (2-fach), in Kombination mit  $\Delta$ Np63 $\alpha$  steigt die Aktivität des Reporters auf das 19-fache an.

Der Einfluss von myc-Tcf-4 und myc- $\Delta$ NTcf-4 auf die CRT wird deutlich, wenn  $\beta$ -Catenin im verwendeten System überexprimiert wird. Die Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Reporters wird durch zusätzliche  $\beta$ -Catenin-Expression vervierfacht. Werden  $\beta$ -Catenin und myc-Tcf-4 koexprimiert, verdoppelt sich die Aktivität im Vergleich zur Aktivität nach  $\beta$ -Catenin-Expression (8-fach). Das dominant negative myc- $\Delta$ NTcf-4 verhindert die Aktivierung der CRT, die Aktivität des Reporters sinkt unter die durch  $\beta$ -Catenin-Expression induzierte Aktivität (2-fach). Dies entspricht der Aktivität nach der Einzelexpression von myc- $\Delta$ NTcf-4. Die Koexpression von  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  führt zu einem Anstieg der endogenen Reporteraktivität auf das 59-fache und verstärkt damit die durch  $\beta$ -Catenin-Expression vermittelte Aktivierung 15-fach. Die zusätzliche Koexpression von myc-Tcf-4 verdreifacht die Aktivität noch einmal. Dies entspricht einem Anstieg der endogenen CRT auf das 165-fache und der durch  $\beta$ -Catenin-Expression vermittelten CRT auf das 41-fache. Die Koexpression von  $\beta$ -Catenin, myc- $\Delta$ NTcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  führt zu einem Anstieg der endogenen Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Reporters auf das 15-fache. Dies liegt etwas unter der

Aktivität, die durch Koexpression von myc- $\Delta$ NTcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  erzielt wird und scheint somit  $\beta$ -Catenin-unabhängig zu sein.



**Abbildung 23: Untersuchung der Funktion von Tcf-4 bei der  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -vermittelten  $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkriptionsaktivierung.**

1,0x10<sup>5</sup> H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor, 400ng pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$ , 160ng pCIneo- $\beta$ -Catenin, 64ng pcDNA3-myc-Tcf-4, 64ng pcDNA3-myc- $\Delta$ NTcf-4 und 200ng pGL3-OT transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit 50ng pRL-*tk* versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf 1200ng aufgefüllt. Wie in Abbildung 8 beschrieben, wurde 24h p.t. ein dualer Luziferaseassay durchgeführt. Die dargestellten Luziferaseaktivitäten repräsentieren die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente und sind relativ zur Aktivität der Vektorkontrolle des Reporters dargestellt. Die Expression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , myc-Tcf-4 (66kDa) und myc- $\Delta$ NTcf-4 wurde mittels WB nachgewiesen. Eine  $\beta$ -Actin-Färbung wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt. Dazu wurde die NC-Membran zuerst mit einem AK gegen das myc-Epitop gefärbt, gestrippt und anschliessend mit AK gegen p63 und  $\beta$ -Actin nachgefärbt.

Betrachtet man sich die Expression von myc-Tcf-4, myc- $\Delta$ NTcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  im WB, wird myc-Tcf-4 einzeln nur schwach exprimiert. Myc- $\Delta$ NTcf-4 wird stärker exprimiert. Da die kodierenden Sequenzen für beide Proteine in den gleichen Expressionsvektor kloniert wurden, könnte die unterschiedliche Färbung der Proteine im WB durch unterschiedliche Proteinstabilität von myc-Tcf-4 und myc- $\Delta$ NTcf-4 zustande kommen. Die Koexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  führt zu einer leichten Akkumulation beider Proteine. Vermutlich verstärkt  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die Expression beider Proteine, indem es den CMV-Promotor der Expressionsplasmide

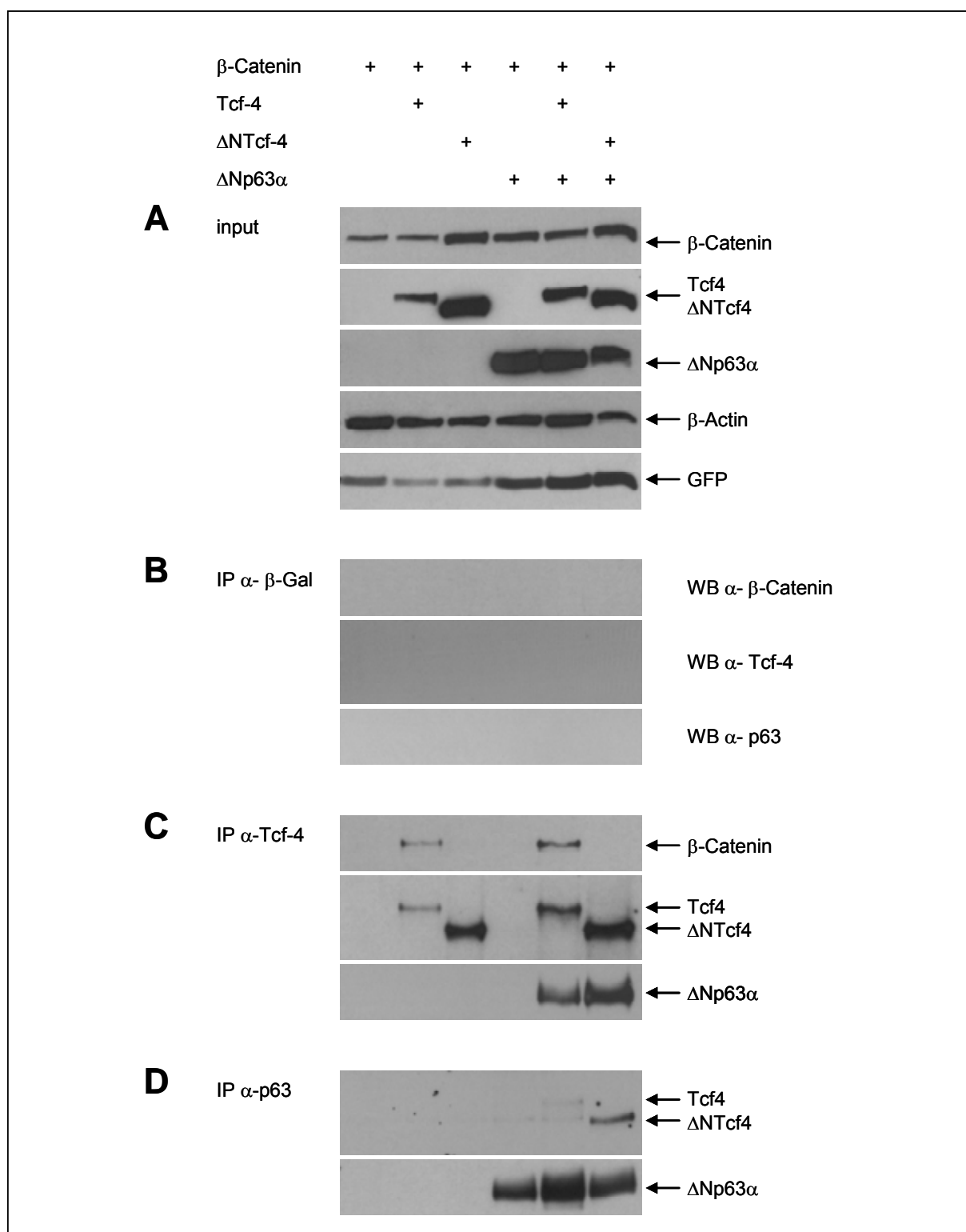
aktiviert. Hinweise dafür ergeben sich aus Abbildung 10.  $\Delta\text{Np63}\alpha$  ist in der Lage, die Luziferaseaktivität des pGL3-Promoter Reporterplasmides zu aktivieren. Dieser Reporter enthält einen SV40-Promotor, der in eukaryotischen Zellen ähnlich wie der CMV-Promotor konstitutiv aktiv ist. In Abbildung 24 wird als Transfektionskontrolle das Plasmid pCMV-eGFP mitgeführt. Auch hier akkumuliert ein durch den CMV-Promotor reguliertes Fremdgen nach Koexpression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$ . Aufgrund der starken Aktivierung der CRT durch  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  können die Unterschiede in der Expression von myc-Tcf-4 und myc- $\Delta\text{NTcf-4}$  vernachlässigt werden.

$\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  kooperieren somit bei der Aktivierung der CRT in H1299-Zellen. Obwohl myc-Tcf-4 und  $\Delta\text{Np63}\alpha$   $\beta$ -Catenin in den Zellkern relokalisieren, ist für die spezifische Aktivierung der CRT die zusätzliche Expression von  $\beta$ -Catenin notwendig.

#### 5.4.2 Tcf-4 bildet einen Proteinkomplex mit $\beta$ -Catenin und mit $\Delta\text{Np63}\alpha$

Nachdem wir sowohl in Immunfluoreszenzanalysen als auch in Funktionsanalysen die Kooperation von  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  bei der Relokalisation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern bzw. der Aktivierung der CRT zeigen konnten, haben wir uns die Frage gestellt, inwiefern diese drei Proteine miteinander Protein-Protein-Interaktionen eingehen. Patturajan *et al.* konnten in nukleären Lysaten von HNSCC 013 Zellen (head and neck squamous cell carcinoma) endogenes  $\beta$ -Catenin und endogenes  $\Delta\text{Np63}\alpha$  in einem präzipitierbaren Komplex nachweisen (Patturajan *et al.*, 2002).

Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit dem Kontrollplasmid pCMV-eGFP und gleichen Mengen von Expressionsplasmiden für  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4, myc- $\Delta\text{NTcf-4}$  und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Um eine Aussage über die Bildung von Proteinkomplexen treffen zu können, wurden die Zellen 24h p.t. geerntet, lysiert und mittels spezifischer AK gefällt (4.3.3). Ein Teil der Lysate wurde zur Kontrolle der Expression der Proteine  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4, myc- $\Delta\text{NTcf-4}$  und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine NC-Membran übertragen und mittels WB analysiert. Dabei diente eine  $\beta$ -Actin-Färbung zum Vergleich der Gesamtproteinmengen der Lysate, eine GFP-Färbung diente dem Vergleich der Transfektionseffizienz der Ansätze. Die restlichen Lysate wurden aufgeteilt und zu gleichen Teilen in eine IP mit einem unspezifischen Kontrollantikörper, einem AK gegen Tcf-4 und einem AK gegen p63 eingesetzt. Die Präzipitate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und WB analysiert.



**Abbildung 24: Koimmunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  aus Zelllysaten.**

$1,6 \times 10^6$  H1299-Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit leerem Vektor,  $6,1 \mu\text{g}$  pcDNA3- $\Delta$ Np63 $\alpha$ , pCneo- $\beta$ -Catenin und pcDNA3-myc-Tcf-4 transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden mit  $0,9 \mu\text{g}$  pCMV-eGFP versehen und mit dem Vektor pcDNA3 auf  $19,2 \mu\text{g}$  aufgefüllt. 24h p.t. wurden die Zellen lysiert. Je ein Viertel der Zelllysate wurde in die Immunpräzipitation (IP) mit verschiedenen spezifischen AK eingesetzt. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels WB analysiert. Dazu wurden nacheinander  $\beta$ -Catenin-, Tcf-4- und p63-Färbungen durchgeführt. Im Anschluss an jede Färbung wurde die NC-Membran gestrippt. **A:** Input-Kontrolle: Zelllysate vor der IP. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\beta$ -Catenin und myc-Tcf-4 wurde mittels WB nachgewiesen. Zum Nachweis gleicher



Transfektionseffizienzen wurde eine GFP-Färbung (27kDa), zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate wurde eine  $\beta$ -Actin-Färbung durchgeführt. Im Anschluss an jede Färbung wurde die NC-Membran gestrippt. **B:** Negativkontrolle: IP  $\alpha$ - $\beta$ -Gal. **C:** IP  $\alpha$ -Tcf-4. **D:** IP  $\alpha$ -p63.

In Abbildung 24A ist die Expression von  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4, myc- $\Delta$ NTcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  vor der Immunpräzipitation dargestellt. Anhand der  $\beta$ -Actin-Färbung ist zu erkennen, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden. Die Expression von eGFP steigt nach Koexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  an. Dies beruht vermutlich auf einer Aktivierung des CMV-Promotors durch  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , wie in Kapitel 5.4.1 für die Expression von myc-Tcf-4 und myc- $\Delta$ NTcf-4 beschrieben.  $\beta$ -Catenin ist in allen Lysaten in vergleichbaren Mengen nachweisbar. Die Expression von myc- $\Delta$ NTcf-4 ist wie in Abbildung 23 dargestellt etwas stärker als die Expression von myc-Tcf-4. Im Vergleich zur eGFP-Expression führt die zusätzliche Expression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  nicht zu einer deutlichen Verstärkung der Expression von  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 oder myc- $\Delta$ NTcf-4, obwohl alle Expressionsplasmide die Fremdgenexpression über einen CMV-Promotor steuern. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich im Verhältnis der transfizierten Expressionsplasmide zueinander begründet. In dem in Abbildung 23 dargestellten Experiment betrug das Verhältnis der Expressionsplasmide für  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und myc-Tcf-4 bzw. myc- $\Delta$ NTcf-4 6,3:1. Für die Koimmunpräzipitationsansätze betrug das Verhältnis der Expressionsplasmide für  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und eGFP 6,8:1, während das Verhältnis der Expressionsplasmide für  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4 bzw. myc- $\Delta$ NTcf-4 1:1 betrug. Ein  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -vermittelter Anstieg der CMV-Promoter-gesteuerten Fremdgenexpression ist vermutlich nur bei einer deutlichen Überexpression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  im Vergleich zu einem anderen Fremdgen zu beobachten. Die Expression von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in den Lysaten ist vergleichbar.

Um zu kontrollieren, ob  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 oder p63 unspezifische Interaktionen mit der für die Präzipitation verwendeten PAS oder mit einem beliebigen AK eingehen können, wurde ein Drittel der Lysate in eine Immunpräzipitation mit einem AK gegen  $\beta$ -Gal eingesetzt. Die WB-Färbungen der Präzipitate mit spezifischen AK gegen  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und p63 sind in Abbildung 24B dargestellt. Für diese Kontrolle wurde der Röntgenfilm über Nacht exponiert.  $\beta$ -Catenin, myc-Tcf-4, myc- $\Delta$ NTcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  gehen keine unspezifischen Interaktionen mit der PAS oder einem unspezifischen AK ein.

Der Tcf-4-spezifische AK präzipitiert myc-Tcf-4 und myc- $\Delta$ NTcf-4 (Abbildung 24C). Die präzipitierten Proteinmengen entsprechen den myc-Tcf-4- und myc- $\Delta$ NTcf-4-Proteinmengen der Lysate (Abbildung 24A, input-Kontrolle). Überexprimiertes  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  werden in Abwesenheit von myc-Tcf-4 und myc- $\Delta$ NTcf-4 durch diesen AK nicht gefällt. Wie zu erwarten war, bilden myc-Tcf-4 und  $\beta$ -Catenin einen präzipitierbaren Komplex. Dagegen

ist myc- $\Delta$ NTcf-4, dem die ersten 30 AS und damit die Interaktionsdomäne mit  $\beta$ -Catenin fehlt, nicht mehr in der Lage,  $\beta$ -Catenin zu kopräzipitieren (Korinek et al., 1997).  $\Delta$ Np63 $\alpha$  befindet sich sowohl mit myc-Tcf-4 als auch mit myc- $\Delta$ NTcf-4 in einem präzipitierbaren Komplex. Dabei bindet das in den Lysaten stärker exprimierte myc- $\Delta$ NTcf-4 auch mehr  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . Die Interaktion von myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  hat keinen Einfluss auf die Interaktion von myc-Tcf-4 und  $\beta$ -Catenin.

Um die Beobachtung zu verifizieren, dass myc-Tcf-4 und myc- $\Delta$ NTcf-4 einen Proteinkomplex mit  $\Delta$ Np63 $\alpha$  bilden, wurde ein Drittel der Lysate mit einem AK gegen p63 gefällt (Abbildung 24D). Der p63-spezifische AK präzipitiert  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . Myc-Tcf-4 und myc- $\Delta$ NTcf-4 werden in Abwesenheit von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  durch diesen AK nicht gefällt. Mit dem p63-spezifischen AK lassen sich ebenfalls  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -myc-Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$ -myc- $\Delta$ NTcf-4 Proteinkomplexe präzipitieren. Obwohl etwa gleiche  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Proteinmengen präzipitiert werden, wird myc- $\Delta$ NTcf-4 deutlich besser kopräzipitiert als myc-Tcf-4. Dies könnte daran liegen, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  im Überschuss vorliegt und das gesamte myc-Tcf-4 bzw. myc- $\Delta$ NTcf-4 kopräzipitiert wird. Da mehr myc- $\Delta$ NTcf-4 als myc-Tcf-4 in den Lysaten vorhanden ist, wird auch mehr myc- $\Delta$ NTcf-4 gefällt als myc-Tcf-4. Desweiteren könnte die Deletion der ersten 30 Aminosäuren von Tcf-4 zu einer Konformationsänderung des Proteins führen, die wiederum die Bindung an  $\Delta$ Np63 $\alpha$  begünstigt. Eine Interaktion von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und  $\beta$ -Catenin konnte entgegen den Daten von Patturajan *et al.* nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) (Patturajan et al., 2002).

Damit konnte mittels Koimmunpräzipitationen gezeigt werden, dass Tcf-4 einen Proteinkomplex sowohl mit  $\beta$ -Catenin als auch mit  $\Delta$ Np63 $\alpha$  bildet.  $\beta$ -Catenin und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  interagieren mit Tcf-4 über unterschiedliche Proteinbindungsdomänen. Dies legt die Vermutung nahe, dass im Zellkern vermutlich alle drei Proteine über Tcf-4 einen gemeinsamen Proteinkomplex bilden.

## 6 Diskussion

$\Delta Np63\alpha$  ist ein zu p53 homologes Protein, das spezifische Gene auf Ebene der Transkription reguliert. Im Unterschied zu p53 werden durch die Verwendung eines zusätzlichen Promotors und alternativen Spleißens verschiedene p63-Isoformen exprimiert, die sich auch funktional unterscheiden. Aufgrund der Aminosäurehomologien innerhalb der DNA-bindenden Proteindomänen von p53 und den p63-Isoformen, können p63-Proteine auch an p53-responsive DNA-Elemente binden und damit p53-responsive Gene transkriptionell regulieren. So fungiert das N-terminal trunkierte  $\Delta Np63\alpha$ , dem die Transaktivierungsdomäne fehlt, als Antagonist des Tumorsuppressors p53 und übt diesbezüglich eine onkogene Funktion aus. Ob es sich bei dem p63-Gen um ein Tumorsuppressorgen oder ein Onkogen handelt und welche Rolle p63-Proteine bei der Tumorentstehung spielen, wird intensiv untersucht und kontrovers diskutiert (Barbieri and Pietenpol, 2006; Blandino and Dobbelstein, 2004; Mills, 2006; Yang and McKeon, 2000).

Wir haben uns die Frage gestellt, ob  $\Delta Np63\alpha$  unabhängig von p53 Gene reguliert, die zur Entstehung eines malignen Phänotyps beitragen. Dabei könnte es sich um Gene handeln, deren Produkte innerhalb von wachstumsregulierenden Signaltransduktionswegen essentielle regulatorische Funktionen ausüben. Patturajan *et al.* konnten zeigen, dass  $\Delta Np63\alpha$  die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und die CRT aktiviert (Patturajan *et al.*, 2002).  $\beta$ -Catenin ist ein multifunktionales Protein. An der Plasmamembran vermittelt  $\beta$ -Catenin über E-Cadherin interzelluläre Adhäsion, während es im Zellkern als Effektor des kanonischen Wnt-Signalweges fungiert und gemeinsam mit den Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsive Gene transkriptionell aktiviert. Wnt-Signaltransduktionswege bilden ein komplexes Netzwerk und kontrollieren die Zellproliferation während der Entwicklung und der Onkogenese (Logan and Nusse, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von  $\Delta Np63\alpha$  im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg charakterisiert. Unter Verwendung eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Reporterassays konnten wir zeigen, dass tetrameres  $\Delta Np63\alpha$  die CRT synergistisch mit  $\beta$ -Catenin bzw.  $\beta$ -Catenin und Tcf-4 verstärkt. Der Einfluss von p63 auf die CRT ist spezifisch, da es durch die Homologen p53 und p73 in seiner Funktion nicht ersetzt werden konnte und keinen Einfluss auf die Gli-1 regulierte Transkription zeigte. Während  $\Delta Np63\alpha$  keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge von  $\beta$ -Catenin zeigte, bildet es einen Komplex mit Tcf-4. Wir vermuten, dass Tcf-4 gleichzeitig mit  $\beta$ -Catenin und  $\Delta Np63\alpha$  interagiert und  $\Delta Np63\alpha$  als Kofaktor der  $\beta$ -Catenin-Tcf-regulierten Transkription die CRT verstärkt.

### 6.1 $\Delta$ Np63 $\alpha$ : ein spezifischer Aktivator der CRT

Mit Hilfe eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Luziferase-Reporterassay-Systems konnten wir zeigen, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in 293- und H1299-Zellen die CRT in Kooperation mit  $\beta$ -Catenin und Tcf-4 aktiviert (Abbildung 8, Abbildung 16, Abbildung 23). Im Gegensatz zum Wnt-Signalweg beeinflusst  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die Gli-1-regulierte Transkription des Shh-Signalweges nicht (Abbildung 10). Aus dieser Beobachtung schließen wir, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die CRT spezifisch aktiviert.

Obwohl p53, p63 und p73 auf AS-Ebene große Homologien aufweisen, können das ebenfalls N-terminal trunkierte  $\Delta$ Np73 $\alpha$  und p53, das eine N-terminale TAD enthält,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  bei der Aktivierung der CRT in H1299-Zellen nicht ersetzen (Abbildung 11). Interessanterweise konnten Ueda *et al.* zeigen, dass TAp73 $\beta$  in Saos-2-Zellen ein  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsives Luziferasereporter gen transaktiviert und die durch Wnt-3a oder exogen exprimiertes  $\beta$ -Catenin induzierte Genexpression synergistisch verstärkt, während eine N-terminale Deletionsmutante von TAp73 $\beta$  keinen Effekt auf die Reporter genexpression zeigt (Ueda *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen in H1299-Zellen aktiviert N-terminal trunkiertes p73 die CRT in Saos-2-Zellen nicht. Allerdings haben wir uns die Frage gestellt, ob auch andere p63-Isoformen die CRT in unserem System regulieren und wenn ja, in welcher Form. Vergleicht man die Aktivität der verschiedenen p63-Isoformen, so handelt es sich bei den N-terminal trunkierten  $\Delta$ Np63-Isoformen um die stärksten Aktivatoren der CRT (Abbildung 13). Diese Beobachtung erscheint aufgrund der fehlenden TAD überraschend, allerdings konnten verschiedene Arbeitsgruppen zusätzliche TAD in  $\Delta$ Np63 identifizieren. So konnten Dohn *et al.* zeigen, dass es sich bei den AS 1-26 von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  um eine putative TAD handelt (Dohn *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass ein PXXP-Motiv innerhalb dieser Domäne für die transaktivierende Funktion von  $\Delta$ Np63-Isoformen notwendig ist (Helton *et al.*, 2006). PXXP-Motive fungieren als Ligandenbindungsstelle für Proteine, die eine Src-Homology-3-Domäne besitzen (Cohen *et al.*, 1995; Feller *et al.*, 1994). Auch in den Prolin-reichen Domänen von p53 (Walker and Levine, 1996; Zhu *et al.*, 1999) und p73 (Agami *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004; Nozell *et al.*, 2003) wurden PXXP-Motive beschrieben, die die transkriptionelle Aktivität von p53 und p73 regulieren. Ein möglicher Interaktionspartner von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  könnte die Prolylisomerase Pin1 sein. Pin1 katalysiert die cis/trans-Isomerisierung an phosphorylierten Serin-Prolin- oder Threonin-Prolin- Motiven von p53 und p73 (Mantovani *et al.*, 2004a; Mantovani *et al.*, 2004b). Dazu interagiert es über seine WW-Domäne mit p53 und p73 und moduliert dadurch u.a. deren Interaktion mit der DNA und mit Kofaktoren. Unveröffentlichte Daten von G. Del Sal lassen vermuten, dass Pin1 zur Promoterselektion und zur Stabilisierung transkriptioneller Komplexe von p53 und p73 beiträgt (Braithwaite *et al.*, 2006).  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und  $\Delta$ Np63 $\beta$  besitzen im Vergleich zu  $\Delta$ Np63 $\gamma$  ein C-terminales PPXY-Motiv (Helton *et al.*, 2006).

PPXY Motive bilden Ligandenbindungsstellen für Proteine, die eine WW-Domäne besitzen (Macias et al., 1996). Das Motiv sowie die umgebenden AS können die Transaktivierung von Zielgenen, wie für p73 (Aqeilan et al., 2004; Miyazaki et al., 2003; Rossi et al., 2005; Strano et al., 2001) bereits beschrieben, verstärken bzw. regulieren. Die Aktivität von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und  $\Delta\text{Np63}\beta$  unterscheidet sich in unterschiedlichen Zelllinien. Während die Aktivität des C-terminal längsten Proteins,  $\Delta\text{Np63}\alpha$ , in 293-Zellen deutlich die Aktivität der anderen p63-Isoformen bei der CRT übertrifft (Daten nicht gezeigt), aktiviert das C-terminal trunkierte  $\Delta\text{Np63}\beta$  in H1299-Zellen die CRT um ein vielfaches stärker als  $\Delta\text{Np63}\alpha$  (Abbildung 13). Diese Beobachtung ist vermutlich auf Unterschiede der Zelllinien, z.B. die differentielle Expression von Transkriptionskofaktoren, zurückzuführen. So konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass die p63-vermittelte Transaktivierung sowohl durch die verwendeten Reportersysteme als auch durch die verwendeten Zellsysteme beeinflusst wird (Ikawa et al., 1999; Kato et al., 1999; McGrath et al., 2001; Shimada et al., 1999).  $\Delta\text{Np63}\alpha$  besitzt im Vergleich zu  $\Delta\text{Np63}\beta$  zwei zusätzliche putative Protein-Protein-Interaktions-Domänen, über die es je nach Zellsystem mit Repressoren oder Aktivatoren der CRT interagieren könnte. Sowohl die SAM-Domäne (Thanos et al., 1999) als auch die TID, die sich direkt an die SAM-Domäne anschließt, wurden als Protein-Protein-Interaktionsmodule beschrieben (Ghioni et al., 2002; Serber et al., 2002). Die SAM-Domäne von p63 $\alpha$  ist eine dominante transkriptionelle Repressordomäne, die ihre Funktion vermutlich durch die Interaktion mit zellulären Korepressoren ausübt (Ghioni et al., 2002). Die letzten 71 AS des C-Terminus von p63 $\alpha$  enthalten ebenfalls eine inhibitorische Domäne (TID), die sowohl notwendig als auch ausreichend ist, die Aktivität von p63 zu inhibieren (Serber et al., 2002). Dies geschieht u.a. über die Assoziation anderer Proteine mit der TID, die wiederum die Stabilität und Aktivität von p63 modulieren (z.B. Sumo-1 (Ghioni et al., 2005)). Ob die unterschiedlichen TAD und Repressordomänen an der p63-vermittelten Transaktivierung der CRT beteiligt sind und auf welche Art und Weise sie die CRT modulieren, bleibt durch Mutationsanalysen zu klären.

Untersuchungen mit physiologisch relevanten  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -Mutanten, die einen AS-Austausch innerhalb der DBD (EEC-Mutante) oder der SAM-Domäne (AEC-Mutante) enthalten, führten in H1299-Zellen nicht zu einer Aktivierung der CRT (Abbildung 15). Die EEC-Substitutionsmutante  $\Delta\text{Np63}\alpha$  C306R enthält eine Missense-Mutation innerhalb der DBD von p63. Celli *et al.* haben ein Modell der DBD von p63, basierend auf der bekannten Struktur der DBD von p53 (Cho et al., 1994) entwickelt (Celli et al., 1999). Die Autoren vermuten, dass die Substitution C306R die DNA-Bindungskapazität von p63 durch strukturelle Deformation des Proteins vermindert. Eine intakte bzw. funktionale DBD ist vermutlich für die  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -vermittelte Transaktivierung der CRT notwendig. Ob  $\Delta\text{Np63}\alpha$  über seine DBD direkt

an Tcf/Lef-responsive DNA-Elemente bindet oder es über die DBD Protein-Protein-Interaktionen mit Transkriptionskofaktoren eingeht, wie es für andere Proteine beschrieben wurde (Strano et al., 2002; Wissmuller et al., 2006), bleibt offen. Mutationsanalysen und EMSA bzw. ChIP-Experimente könnten *in vitro* bzw. *in vivo* einen Hinweis darauf geben. Anhand eines Homologiemodells der SAM-Domänen von p63 und p73 ((Chi et al., 1999)) konnten McGrath *et al.* zeigen, dass in der von uns untersuchten Mutante  $\Delta\text{Np63}\alpha$  L518F eine AS substituiert ist, die innerhalb des Proteins angeordnet ist und damit vermutlich die Gesamtstruktur und Stabilität des Proteins beeinflusst (McGrath et al., 2001). In Funktionsassays zeigte  $\Delta\text{Np63}\alpha$  L518F im Gegensatz zu *wt*  $\Delta\text{Np63}\alpha$  keinen inhibitorischen Effekt auf die Transaktivierungsaktivität von p53 und TAp63 $\gamma$ . Aus diesen Beobachtungen leiten die Autoren die Vermutung ab, dass p63 über die SAM-Domäne eine bisher unbekannte Protein-Protein-Interaktion mit einem transkriptionellen Modulator der p63-Aktivität eingeht. Dieser könnte, so diskutieren sie, sowohl die DNA-Bindungskapazität der p63 $\alpha$ -Isoformen als auch die Repression von p53 und TAp63 $\gamma$  vermitteln. Vergleicht man die Aktivität von  $\Delta\text{Np63}\alpha$ ,  $\Delta\text{Np63}\beta$  und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  L518F die CRT in H1299-Zellen zu aktivieren, so ergibt sich folgende Hypothese:  $\Delta\text{Np63}\alpha$  aktiviert in H1299-Zellen die CRT.  $\Delta\text{Np63}\beta$ , dem die SAM-Domäne und die TID als putative Repressordomänen fehlen, ist ein deutlich stärkerer Aktivator der CRT. D.h., die Aktivität von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  wird in H1299-Zellen vermutlich durch die Interaktion des Proteins mit einem transkriptionellen Repressor vermindert. Dagegen ist  $\Delta\text{Np63}\alpha$  L518F, das eine Mutation in der SAM-Domäne trägt, nicht in der Lage, die CRT zu aktivieren. Damit ergeben sich zwei mögliche Ursachen für den Funktionsverlust der AEC-Mutante. 1) Der Hypothese von McGrath *et al.* folgend, könnte die Mutation in der SAM-Domäne die Interaktion mit einem Faktor X verhindern, der die DNA-Bindung von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  vermittelt (McGrath et al., 2001). Dafür spricht, dass der Phänotyp der AEC-Mutante in unserem  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Luziferase-Reporterassay-System dem der EEC-Mutante, die nicht mehr an DNA binden kann, entspricht. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  selbst an die DNA eines  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Promotors bindet, da erst die Koexpression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und  $\beta$ -Catenin bzw.  $\beta$ -Catenin und Tcf-4 die CRT deutlich aktiviert (Abbildung 8, Abbildung 16, Abbildung 23). 2) Der vollständige Funktionsverlust des Proteins ist vermutlich auf die durch die Mutation hervorgerufene globale Strukturveränderung von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  zurückzuführen (Cicero et al., 2006; McGrath et al., 2001).

Unter Verwendung eines spezifischen Inhibitors der Oligomerisierung von p63 konnten wir zeigen, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  die CRT als Tetramer aktiviert. Die Koexpression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und p63DD verhindert die  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -induzierte Transkriptionsaktivierung (Abbildung 14). Weiterführende Experimente mit Punktmutanten von  $\Delta\text{Np63}\alpha$ , die nicht mehr in der Lage sind Dimere bzw. Tetramere zu bilden, haben ebenfalls gezeigt, dass die Dimerisierung bzw.

die Tetramerisierung von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  für die Aktivierung der CRT notwendig ist (Daten nicht gezeigt).

Neben dem Nachweis der  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -induzierten Aktivierung der CRT mit Hilfe des artifiziellen Luziferase-Reporterassay-Systems, bleibt die physiologische Relevanz von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  für den Wnt-Signalweg zu untersuchen. Dies ist möglich, indem man  $\Delta\text{Np63}\alpha$  aus  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -positiven Zellen durch siRNAs entfernt oder es in  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -negativen Zellen transient überexprimiert und die Transkription  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiver Gene mittels quantitativer PCR untersucht. In vielen Fällen ist die Regulation der Wnt-Zielgene zelltypspezifisch, in anderen Fällen werden Zielgene in mehreren Zellen und Geweben induziert (Logan and Nusse, 2004). Daraus ergibt sich für uns die Herausforderung, Zelllinien zu finden, in denen p63 die CRT bestimmter Wnt-responsiver Gene aktiviert.

## 6.2 Ein ternärer Transkriptionskomplex: $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und $\Delta\text{Np63}\alpha$

Es bleibt die Frage zu klären, welchem molekularen Mechanismus die  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -induzierte Aktivierung der CRT unterliegt. Mögliche Ansatzpunkte für  $\Delta\text{Np63}\alpha$  könnten folgende drei Abschnitte des kanonischen Wnt-Signalweges sein:

### 1) Die Regulation der Proteinstabilität von $\beta$ -Catenin.

Der Angriffspunkt von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  wäre in diesem Fall der APC-Komplex einschließlich seiner Komponenten. Wird die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch CK-1 und GSK3- $\beta$  verhindert, kommt es nicht zum proteolytischen Abbau von  $\beta$ -Catenin, sondern zur Akkumulation des Proteins im Zytoplasma.

In 293- und H1299-Zellen konnten wir unter Verwendung des  $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiven Luziferase-Reporterassay-Systems zeigen, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  die CRT in Kooperation mit transient exprimiertem  $\beta$ -Catenin verstärkt. Werden  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und  $\beta$ -Catenin S33Y, eine tumorassoziierte, dominant aktive  $\beta$ -Catenin-Mutante (Morin et al., 1997), koexprimiert, erhält man eine deutlich stärkere Aktivierung der CRT als durch eine der beiden Komponenten allein (Abbildung 16). Im WB sind die Proteinlevels von endogenem, exogenem und exogenem stabilen  $\beta$ -Catenin in 293-Zellen zu unterscheiden. Ein ähnliches Ergebnis konnten wir auch in H1299-Zellen beobachten. Die Expression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  führte im Gegensatz zu den Beobachtungen von Patturajan *et al.* jedoch nicht zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin (Patturajan et al., 2002). Dieses Ergebnis konnten wir auch nach der Behandlung von H1299-Zellen mit NaCl bzw. LiCl verdeutlichen. LiCl inhibiert spezifisch GSK3- $\beta$  und fungiert als Aktivator des Wnt-Signalweges (Klein and Melton, 1996; Stambolic et al., 1996). Während in LiCl-behandelten Zellen eine deutliche Abnahme der

phosphorylierten  $\beta$ -Catenin-Levels zu beobachten ist, nimmt gleichzeitig die Menge an  $\beta$ -Catenin-Gesamtprotein zu. Dagegen beeinflusst  $\Delta Np63\alpha$  in unbehandelten und NaCl-behandelten Zellen weder die Phospho- $\beta$ -Catenin- noch die Gesamt- $\beta$ -Catenin-Levels (Abbildung 17).

## 2) Die Translokation von $\beta$ -Catenin in den Zellkern.

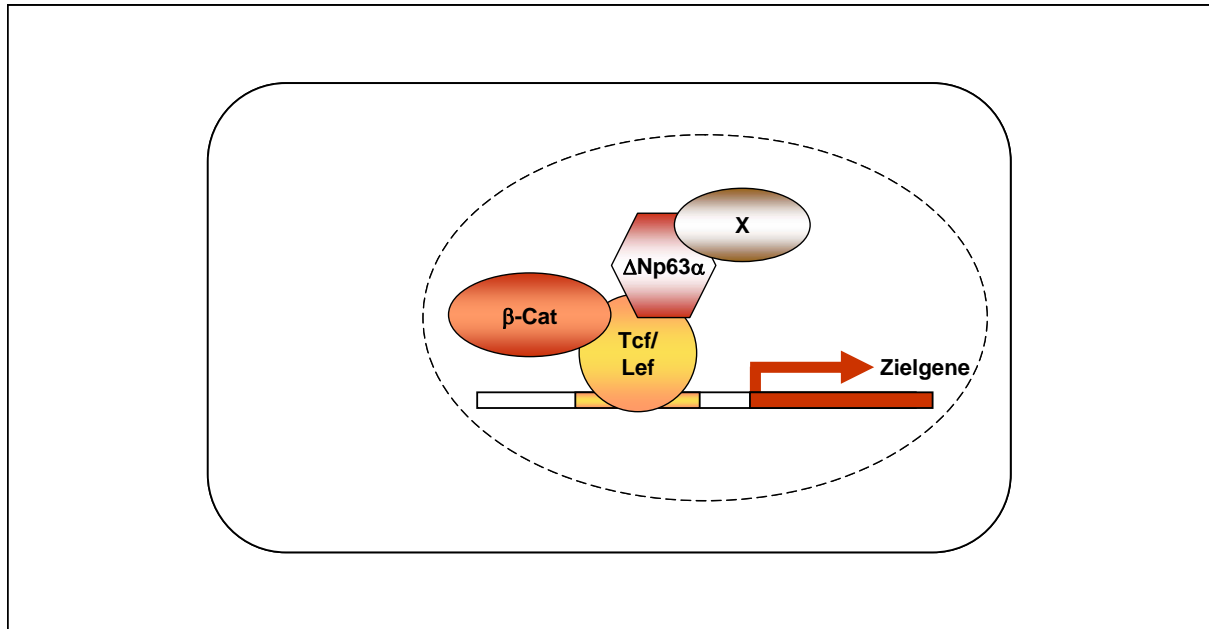
$\beta$ -Catenin besitzt weder ein nukleäres Lokalisationssignal NLS noch ein nukleäres Exportsignal (NES). Aufgrund seines Molekulargewichtes von 92kDa ist eine passive Diffusion von  $\beta$ -Catenin durch Kernporen nicht denkbar. Trotzdem wird es effizient zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her transportiert (Eleftheriou et al., 2001; Kriehoff et al., 2006; Wiechens and Fagotto, 2001; Yokoya et al., 1999). Es wird vermutet, dass die nukleäre Lokalisation und damit auch die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin unter anderem durch dessen nukleären Import durch Faktoren der Tcf/Lef-Familie ((Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Prieve et al., 1998)) und Bcl-9 ((Kramps et al., 2002; Townsley et al., 2004)) bzw. durch dessen nukleären Export durch APC ((Barth et al., 1997; Henderson, 2000; Neufeld et al., 2000a; Neufeld et al., 2000b)) und Axin ((Cong and Varmus, 2004; Tolwinski and Wieschaus, 2001; Wiechens et al., 2004)) reguliert wird.

$\beta$ -Catenin ist in Zellen mit einem normal regulierten Wnt-Signalweg, wie H1299-Zellen, hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Dabei tritt es aufgrund seiner Funktion bei der Zell-Zell-Adhäsion konzentriert an der Zellmembran auf. Tcf-4 und  $\Delta Np63\alpha$  sind nukleär lokalisierte Proteine (Abbildung 18). Wir konnten mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse zeigen, dass exogenes  $\beta$ -Catenin nach Koexpression von Tcf-4 im Zellkern akkumuliert (Abbildung 19). Kriehoff *et al.* konnten mittels FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) in lebenden Zellen zeigen, dass  $\beta$ -Catenin nach Koexpression von Tcf-4 im Zellkern zurückgehalten wird und akkumuliert. Neben der Retention von  $\beta$ -Catenin führt die Koexpression von Tcf-4 zusätzlich zur Abnahme der Mobilität von  $\beta$ -Catenin im Zellkern, indem es durch den Transkriptionsfaktor Tcf-4 zum Chromatingerüst rekrutiert wird (Kriehoff et al., 2006).  $\Delta Np63\alpha$  ist in der Lage, die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin zu verstärken. Nach Koexpression von Tcf-4 und  $\Delta Np63\alpha$  konnten wir auch endogenes  $\beta$ -Catenin im Zellkern nachweisen (Abbildung 20, Abbildung 21). Da die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern von der Tcf-4-Expression abhängt, vermuten wir keine Funktion von  $\Delta Np63\alpha$  bei der Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Allerdings scheint  $\Delta Np63\alpha$  die Tcf-4-vermittelte Kernretention zu verstärken. Möglicherweise bilden  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta Np63\alpha$  im Zellkern einen aktiven Transkriptionskomplex, der vermutlich aufgrund seiner Größe schlechter ins Zytoplasma transportiert wird.



### 3) Die Transkription bzw. die Initiation der Transkription $\beta$ -Catenin-Tcf-responsiver Gene.

$\Delta$ Np63 $\alpha$  könnte als Transkriptionskofaktor mit dem  $\beta$ -Catenin-Tcf-Komplex interagieren und die Bindung zusätzlicher Komponenten der zellulären Transkriptionsmaschinerie vermitteln.



**Abbildung 25: Hypothese:  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  bilden einen aktiven Transkriptionskomplex.**

Tcf-4 interagiert sowohl mit  $\beta$ -Catenin als auch mit  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . Der ternäre Proteinkomplex bindet an Tcf/Lef-responsive DNA-Elemente und verstärkt die CRT. Dabei vermittelt  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die Bindung von Transkriptionskofaktoren und/oder von DNA.

Die Koexpression aller drei Proteine,  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , führt in H1299-Zellen zur stärksten Aktivierung der CRT (Abbildung 23). Allerdings konnten wir im Luziferaseassay keine funktionelle Kooperation von Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  mit endogenem  $\beta$ -Catenin nachweisen (Abbildung 23). Durch Immunpräzipitationen von Tcf-4 und  $\Delta$ NTcf-4 aus transient transfizierten H1299-Zelllysaten konnten wir zeigen, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  einen Komplex mit Tcf-4 bildet (Abbildung 24). Wie zu erwarten war, interagiert Tcf-4 direkt mit  $\beta$ -Catenin, während das N-terminal trunkierte  $\Delta$ NTcf-4 nicht mehr dazu in der Lage ist.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  befindet sich dagegen sowohl mit Tcf-4 als auch mit  $\Delta$ NTcf-4 in einem präzipitierbaren Komplex. Letztere Beobachtung konnten wir durch Immunpräzipitation von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  bestätigen. Unsere Ergebnisse legen des weiteren die Vermutung nahe, dass sich  $\Delta$ Np63 $\alpha$  dem  $\beta$ -Catenin/Tcf-4-Komplex anschließt und damit ein aktiver Transkriptionskomplex bestehend aus  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  gebildet wird (Abbildung 25). Diese Hypothese wird von den Ergebnissen der Koimmunfluoreszenzanalysen unterstützt (Abbildung 22). Einen präzipitierbaren

Komplex von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  und  $\beta$ -Catenin konnten wir im Gegensatz zu Patturajan *et al.* nicht nachweisen (Patturajan *et al.*, 2002).

$\beta$ -Catenin und Tcf/Lef-Faktoren bilden zur Transaktivierung Tcf/Lef-responsiver Gene Multiproteinkomplexe bestehend aus Transkriptionskofaktoren und DNA-modellierenden Enzymen aus. So aktivieren die Produkte der Gene *Legless* (*Lgs*, Homolog des humanen *BCL-9*) und *Pygo*, zwei Segment-Polaritätsgene in *Drosophila*, die Transkription von Wnt-Zielgenen (Kramps *et al.*, 2002). *Lgs/BCL-9* verknüpft dabei Arm/ $\beta$ -Catenin und *Pygo* physisch. Weitere Untersuchungen in *Drosophila*-Zellen haben ergeben, dass Pangolin(Pan)/Tcf/Lef, Arm/ $\beta$ -Catenin und *Lgs/BCL-9* eine lineare Kette von Adaptermolekülen bilden, die *Pygo* als essentiellen Kofaktor der CRT an regulatorische DNA-Elemente der Wingless(Wg)/Wnt-Zielgene leiten (Stadeli and Basler, 2005). Neben *BCL-9* wurde ein ähnliches Protein, *B9L*, als  $\beta$ -Catenin-Interaktionspartner identifiziert (Adachi *et al.*, 2004). Das in kolorektalen Tumoren häufig überexprimierte *B9L* verstärkt die CRT und induziert die  $\beta$ -Catenin-abhängige Transformation von RK3E-Zellen. Im Gegensatz zu *BCL-9* ist die Interaktion von *B9L* mit *Pygo* entbehrlich. Es ist denkbar, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  ähnliche Funktionen innerhalb des  $\beta$ -Catenin-Tcf-4-Transkriptionskomplexes einnimmt. Im Gegensatz zu *Lgs/BCL-9* und *B9L* bindet  $\Delta\text{Np63}\alpha$  jedoch an Tcf-4 und nicht an  $\beta$ -Catenin. Ein solcher ternärer Transkriptionskomplex wurde von Nateri *et al.* für die  $\beta$ -Catenin-Tcf-4-vermittelte Regulation des *c-Jun*-Promotors beschrieben (Nateri *et al.*, 2005). Der *c-Jun*-Promotor enthält neben zwei proximalen AP-1-Bindungsstellen (Jun 1 und Jun 2), über die *c-Jun* seine Transkription selbst reguliert, eine circa 3kb stromaufwärts gelegene Tcf-Konsensussequenz. Die Autoren konnten zeigen, dass ein Transkriptionskomplex bestehend aus  $\beta$ -Catenin, Tcf-4 und phosphoryliertem *c-Jun* *in vivo* an die AP-1-Bindungsstellen und die Tcf-Konsensussequenz des *c-Jun*-Promotors bindet und die Transkription des *c-Jun*-Gens kooperativ aktiviert. Als Mechanismus für die kooperative Aktivierung der Transkription vermuten Nateri *et al.* die Rekrutierung von  $\beta$ -Catenin über dessen Interaktion mit Tcf-4 und der gleichzeitigen Interaktion von Tcf-4 mit phosphoryliertem *c-Jun* zu den proximalen AP-1-Bindungsstellen in der Nähe des Transkriptionsstartes.  $\Delta\text{Np63}\alpha$  könnte durch die Interaktion mit Tcf-4 die Transkription spezifischer Gene über einen vergleichbaren Mechanismus aktivieren. Allerdings ist die Bindung eines genspezifischen Promotorelementes innerhalb unseres Reporterassaysystems nicht möglich. Dies könnte nur durch die Untersuchung endogener Genexpression ermittelt werden. Aufgrund der Luziferasedaten stellt die  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -vermittelte Rekrutierung von Transkriptionskofaktoren an den  $\beta$ -Catenin-Tcf-4-Komplex wahrscheinlich die Ursache für die Aktivierung der CRT dar.

Um den Mechanismus der  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -vermittelten Aktivierung der CRT aufzuklären, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei gilt es primär mittels ChIP zu

analysieren, ob der ternäre Proteinkomplex *in vivo* an Tcf/Lef-responsive DNA-Elemente bindet. Weitere offene Fragen lauten: Bindet  $\Delta\text{Np63}\alpha$  selbst an DNA und/oder rekrutiert es Transkriptionskofaktoren an den Transkriptionsstart  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsiver Gene? Interagiert und kooperiert  $\Delta\text{Np63}\alpha$  nur mit Tcf-4 oder auch mit Tcf-1, Lef-1 und Tcf-3? Interagieren auch andere p63-Isoformen und p63-Homologe mit Tcf/Lef-Faktoren? Gibt es ein Tiermodell, in dem man die physiologische Relevanz der  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -vermittelten Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges zeigen kann? Führt die Expression von  $\Delta\text{Np63}\alpha$  in *Xenopus laevis* zu einer  $\beta$ -Catenin-vermittelten Duplikation der embryonalen Körperachse?

### 6.3 Ausblick: Der Tcf-4- $\Delta\text{Np63}\alpha$ -Proteinkomplex

Die Strukturanalyse des Tcf-4- $\Delta\text{Np63}\alpha$ -Proteinkomplexes stellt ein interessantes Ziel zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der  $\Delta\text{Np63}\alpha$ -vermittelten Aktivierung der CRT dar. Der  $\beta$ -Catenin-Tcf-4-Proteinkomplex wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die zentrale Region von  $\beta$ -Catenin besteht aus 12 Kopien eines 42 AS langen Sequenzmotivs (*Arm-repeat*), das die Interaktion mit E-Cadherin, APC, Axin und den Faktoren der Tcf/Lef-Familie vermittelt (Behrens et al., 1998; Behrens et al., 1996; Huelsken et al., 1994; Rubinfeld et al., 1995; von Kries et al., 2000; Xing et al., 2003). Die *Arm*-Motive bilden strukturell eine Superhelix aus Helices. Dadurch entsteht eine lange positiv geladene Furche, die durch die Helix des dritten *Arm*-Motivs gebildet wird (Huber et al., 1997).  $\beta$ -Catenin interagiert mit Tcf-4 über dessen N-Terminus. Die  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne (CBD) ist zwischen den Mitgliedern der Tcf/Lef-Familie konserviert (Behrens et al., 1996; Knapp et al., 2001; Korinek et al., 1997; Molenaar et al., 1996; Omer et al., 1999; van de Wetering et al., 1997; von Kries et al., 2000). Aufgrund von strukturellen Untersuchungen haben Graham *et al.* ein Modell der  $\beta$ -Catenin-Tcf-4-Erkennung entwickelt. Die Autoren vermuten, dass die ersten 100 AS von Tcf-4 in ungebindenem Zustand eine willkürliche „Coil“-Struktur ausbilden. Zuerst interagieren die AS 13-31 von Tcf-4, die die minimale  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle definieren, mit  $\beta$ -Catenin. Die AS 40-49 von Tcf-4 bilden aufgrund ihrer Interaktion mit der positiv geladenen Furche der *Arm*-Sequenzmotive eine  $\alpha$ -Helix aus, die sich um die Hauptachse der Superhelix der *Arm*-repeats wickelt (Graham et al., 2001). Tcf-4 und  $\Delta\text{Np63}\alpha$  benötigen zur Interaktion nicht die CBD, dagegen legen die Koimmunpräzipitationsexperimente die Vermutung nahe, dass  $\Delta\text{Np63}\alpha$  sogar effizienter mit  $\Delta\text{NTcf-4}$  interagiert als mit *wt* Tcf-4 (Abbildung 24). Die Ursache dafür könnte in der sterischen Inhibition der Interaktion beider Proteine durch die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Konformationsänderung von Tcf-4 begründet sein. Mit Hilfe von Deletionsmutanten sollen die

minimalen Interaktionsdomänen von Tcf-4 und  $\Delta$ Np63 $\alpha$  experimentell ermittelt werden, um sie nachfolgend einer Kokristallisation zu unterziehen. Putative Protein-Protein-Interaktionsdomänen von Tcf-4 sind die variable Domäne, die HMG-Box und der C-Terminus des Proteins. Tcf-4 interagiert z.B. mit dem Repressor Groucho über seine variable Proteindomäne, die sich zwischen der CBD und der HMG-Box befindet (Brantjes et al., 2001), und mit dem Repressor CtBP1 über seinen C-Terminus (Valenta et al., 2003). SoxE-Proteine interagieren über ihre HMG-Box schwach mit der DBD von zahlreichen Transkriptionsfaktoren in Lösung (Wissmuller et al., 2006). D.h., Tcf-4 könnte möglicherweise über seine HMG-Box mit der DBD von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  interagieren. Von humanen Tumoren abgeleitete p53-Mutanten können *in vitro* und *in vivo* mit p63 über ihre Kerndomänen interagieren, wobei die DBD von p63 für diese Interaktion ausreichend ist (Strano et al., 2002). Als weitere putative Protein-Protein-Interaktionsdomänen von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  wurden die verschiedenen TADs und Repressordomänen bereits in Kapitel 6.1 diskutiert. Ein Beispiel für die Interaktion von p63 mit anderen Transkriptionsfaktoren wurde von Fei *et al.* beschrieben. So interagiert TAp63 $\alpha$  z.B. mit c-Jun, JunB und JunD über die SAM-Domäne und reguliert über die Komplexbildung mit den Transkriptionsfaktoren indirekt die Transkription des kutanen *Human Papilloma Virus* (HPV) 20 Promotors (Fei et al., 2006).

#### 6.4 Physiologische Relevanz: Zusammenspiel von $\Delta$ Np63 $\alpha$ und $\beta$ -Catenin

Wnt-Signaltransduktionswege spielen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und der Onkogenese. Fehlregulationen des Wnt-Signalweges führen zu Anomalien, degenerativen Erkrankungen und Tumoren. Dabei können Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges sowohl aktivierende als auch deaktivierende Mutationen tragen. Mutationen, die die konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges begünstigen, führen zur Onkogenese. Dabei ist die Entkopplung der normalen  $\beta$ -Catenin-Regulation von der Kontrolle der Wnt-Signaltransduktion ein wesentliches Ereignis bei der Entstehung vieler Tumoren (Logan and Nusse, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  die  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-regulierte Transkription aktiviert. Daraufhin haben wir uns gefragt, ob es Hinweise auf ein physiologisch relevantes Zusammenspiel von  $\Delta$ Np63 $\alpha$  und der Wnt-Signaltransduktion bzw. der  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-vermittelten Genregulation gibt.

Die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion induziert u.a. die Bildung der Körperachsen, die Unterteilung des Mesoderms, die Organentwicklung und die Stammzelldifferenzierung (Huelsenken and Birchmeier, 2001; Huelsenken et al., 2001). Daten von  $p63^{-/-}$  Mäusen zeigen eine Schlüsselfunktion für p63 in der Entwicklung von Epithelien, dem Gesichtsschädel und den Extremitäten (Yang and McKeon, 2000). Sowohl die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion

(Andl et al., 2002; Huelsken et al., 2001; van Genderen et al., 1994) als auch p63 (Barbieri and Pietenpol, 2006; Yang and McKeon, 2000) sind für die Entwicklung der Haut und der Hautanhangsgebilde notwendig. Folgendes Beispiel gibt einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion von  $\Delta Np63\alpha$  und der Wnt-Signaltransduktion bei der Entwicklung der Haut: Laurikkala et al. konnten zeigen, dass  $\Delta Np63\alpha$  bereits im einfachen Ektoderm vor Beginn der Morphogenese von Haaren und Zähnen exprimiert wird (Laurikkala et al., 2006). Die Expression wird erst während der Differenzierung von Keratinocyten und Ameloblasten herunterreguliert. Im embryonalen Ektoderm wird die Expression von  $\Delta Np63$  vermutlich durch BMPs (u.a. BMP-2) aktiviert (Bakkers et al., 2002; Laurikkala et al., 2006). Mittels *in situ* Hybridisierung konnten Laurikkala et al. erstmals eine Abnahme von  $\beta$ -Catenin im Oberflächenepithelium von  $p63^{-/-}$  Mausembryonen zeigen. Neben  $\beta$ -Catenin wird eine Reihe anderer bekannter Gene, die mit der Morphogenese von Zähnen und Haaren assoziiert sind, reguliert. In Abwesenheit von p63 arretiert die Entwicklung der Zähne auf Stufe der Zahnlamina, und die Entwicklung von Haarfollikeln wird nicht initiiert. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen, dass p63 mehrere Gene unterschiedlicher Signalwege reguliert, die wiederum die Entwicklung von Plakoden einleiten. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist ein solcher Signalweg, der während der Entwicklung durch p63-reguliert sein könnte. Es ist bekannt, dass  $\beta$ -Catenin die Morphogenese von Haarfollikeln induziert und kontrolliert (Chu et al., 2004; Huelsken et al., 2001). Yang et al. konnten ferner zeigen, dass BMP-2 den kanonischen Wnt-Signalweg, d.h., die Aktivität der Tcf/Lef-Faktoren in humanen Keratinocyten verstärkt (Yang et al., 2006). Da BMP-2 die Expression von  $\Delta Np63\alpha$  aktiviert, ist eine  $\Delta Np63\alpha$ -vermittelte Aktivierung von  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef denkbar. Es sind noch viele Untersuchungen nötig, um ein mögliches Zusammenspiel von  $\Delta Np63\alpha$  und Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion während der Entwicklung genauer zu spezifizieren. Wie das Beispiel der Entwicklung der Haut zeigt, gibt es dafür bereits Anhaltspunkte.

Mutationen in verschiedenen Komponenten der Wnt-Signalkaskade verursachen Tumoren in den unterschiedlichsten Geweben und Organen des Körpers. Die Onkogenese geht dabei immer von einem Moleküldefekt aus, der Aktivierung nukleären  $\beta$ -Catenins. Das bekannteste Beispiel sind Kolonkarzinome, die Mutationen im APC- oder  $\beta$ -Catenin-Gen tragen (Behrens and Lustig, 2004; Giles et al., 2003). Die Rolle von p63 bei der Onkogenese wird kontrovers diskutiert. In den meisten Tumoren ist die p63-Expression jedoch aufrechterhalten und u.a. durch die Amplifikation des p63-Locus überexprimiert (Choi et al., 2002; Hibi et al., 2000; Hu et al., 2002; Massion et al., 2003; Mills, 2006; Park et al., 2000; Tonon et al., 2005). In Plattenepithelkarzinomen sind TAp63- und  $\Delta Np63$ -Isoformen auf Ebene der Transkription spezifisch hochreguliert, auf Proteinebene wird  $\Delta Np63\alpha$  überexprimiert (Cui et al., 2005). Es werden drei mögliche Mechanismen der p63-vermittelten Onkogenese diskutiert: 1) p63

verleiht Tumorzellen Stammzeleigenschaften (Blandino and Dobbstein, 2004). 2) p63 erhält das proliferative Potential in Plattenepithelien (Koster and Roop, 2004; Mills, 2006). 3) p63 aktiviert  $\beta$ -Catenin (Hibi et al., 2000; Patturajan et al., 2002). Unsere Untersuchungen unterstützen einen möglichen Einfluss von  $\Delta Np63\alpha$  auf die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Onkogenese. Patturajan *et al.* haben diskutiert, dass in Adenokarzinomen häufig onkogene Mutationen in Genen auftreten, die für verschiedene Komponenten des Wnt-Signalweges kodieren und die Stabilität von  $\beta$ -Catenin erhöhen. In Plattenepithelkarzinomen (z.B. Lungenkarzinomen) fehlen diese Mutationen, dagegen tragen diese Zellen häufig Amplifikationen des *p63*-Gens oder zeigen eine erhöhte Expression von  $\Delta Np63\alpha$ . Dies könnte, so diskutieren die Autoren, einen alternativen Mechanismus der positiven Regulation  $\beta$ -Catenin/Tcf-responsiver Transkription in Tumorzellen darstellen (Patturajan et al., 2002). Dagegen hat eine immunhistochemische Untersuchung einer großen Kohorte humaner Neoplasien keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Koexpression von  $\Delta Np63$  und nukleärem  $\beta$ -Catenin ergeben (Reis-Filho et al., 2003).

Trotzdem vermuten wir, dass die  $\Delta Np63\alpha$ -vermittelte Aktivierung der CRT in Geweben, die p63 überexprimieren, die Onkogenese initiiert. Der durch die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef erworbene Wachstumsvorteil, u.a. durch die Aktivierung der verschiedenen Wnt-Zielgene (2.5) induziert daraufhin eine Folge weiterer Veränderungen in der Zelle: Veränderungen der architektonischen Struktur, zusätzliche Mutationen und genetische Instabilität, den Verlust von Tumorsuppressoren, Veränderungen in der Zell-Zell-Adhäsion und der Migration. Die betroffenen Zellen beschreiben den Weg von normalen Zellen über Adenome zu Karzinomen und Metastasen (Logan and Nusse, 2004). Die Hypothese der p63-vermittelten Initialisierung der Onkogenese geht mit der Beobachtung konform, dass mit fortschreitender Entartung zu invasiven und metastatischen Tumoren der Verlust der p63-Expression z.B. in Harnblasentumoren (Urist et al., 2002) und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Morita et al., 2005; Takahashi et al., 2006) assoziiert ist. Die p63-vermittelte Aktivierung der CRT wird zu diesem Zeitpunkt nicht mehr benötigt. Das unterstützt die Beobachtung, dass mit dem Verlust der *p63*-Expression in Harnblasentumoren reduzierte  $\beta$ -Catenin-Levels einhergehen (Koga et al., 2003a; Koga et al., 2003b). D.h., es gibt Anhaltspunkte dafür, dass p63 unabhängig von p53 über den Wnt-Signalweg nicht nur in Entwicklungsprozesse eingreifen kann, sondern auch in die Initialisierung der Onkogenese involviert sein könnte. Dies muss allerdings durch weitere Untersuchungen an humanen Tumoren belegt und näher charakterisiert werden.

## 6.5 p63 – ein multifunktionales Protein

Der *p63*-Locus kodiert für eine Reihe von Proteinen, deren Funktion in der Entwicklung und Aufrechterhaltung mehrschichtiger Plattenepithelien liegt. Es handelt sich um Transkriptionsfaktoren, die unterschiedlichste biologische Prozesse modulieren können. p63-Proteine verbinden sowohl tumorsuppressorische als auch onkogene Eigenschaften. Sie können mit DNA und Proteinen Interaktionen eingehen und damit in den Zellzyklus eingreifen. Neben TAp63- und  $\Delta$ Np63-Isoformen können die einzelnen Proteine je nach ihrem Interaktionspartner die Transkription verschiedenster Gene aktivieren oder reprimieren. p63, speziell  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , kann in eine Reihe mit anderen multifunktionalen Transkriptionsfaktoren wie dem ubiquitären Transkriptionsfaktor Yin Yang 1 (YY1) eingeordnet werden. YY1, ein Mitglied der GLI-Krüppel Genfamilie, ist von wesentlicher Bedeutung für normale biologische Prozesse wie die Embryogenese, die Differenzierung, die Replikation und zelluläre Proliferation und weist zudem das Potential auf, als Initiator der Onkogenese zu fungieren. YY1 reguliert responsive Gene, indem es deren Transkription initiiert, aktiviert oder reprimiert. Seine Funktion übt es direkt, indirekt über die Rekrutierung von Kofaktoren oder durch die Zerstörung von DNA-Bindungsstellen und Konformationsänderungen der DNA aus (Gordon et al., 2006).

In dieser Arbeit konnten wir das erste Mal zeigen, dass  $\Delta$ Np63 $\alpha$  einen Komplex mit Tcf-4 bildet und vermutlich zusammen mit  $\beta$ -Catenin und Tcf-4 die Transkription von  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-responsiven Genen aktiviert. Damit handelt es sich bei  $\Delta$ Np63 $\alpha$  nicht nur um einen transkriptionellen Repressor, sondern auch um einen Aktivator der Transkription, der über den kanonischen Wnt-Signalweg, einem bedeutenden wachstumsregulatorischen Signalweg, die Möglichkeit besitzt, sowohl in  $\beta$ -Catenin-vermittelte Entwicklungsprozesse als auch in die Onkogenese eingreifen zu können.

## 7 Anhang

### **Adenovirus Typ 2 und Typ 5 E1A wird unterschiedlich stark exprimiert**

#### **7.1 Zusammenfassung**

Adenoviren stellen ein umfangreich untersuchtes Modellsystem für die Onkogenese und für die experimentelle Krebstherapie dar. Bei den am besten untersuchten Virustypen handelt es sich um Adenovirus Typ 2 und Typ 5. In bisherigen Studien wurden beide Virustypen kaum unterschieden. Zudem sind verschiedene rekombinante therapeutische Adenoviren Hybride beider Virustypen, so zum Beispiel *d/1520/Onyx015*.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Virusreplikation der *wildtypischen* Adenoviren WtD (einem Hybrid aus der E1-Region von Adenovirus Typ 2 und dem restlichen Genom von Adenovirus Typ 5) und *d/309* (Adenovirus Typ 5) im Vergleich zu den Mutanten *d/1520* (Hybrid) und *d/338* (Adenovirus Typ 5), denen ein Teil der kodierenden Region für das E1B-55kDa Protein fehlt, untersucht.

Dabei haben wir herausgefunden, dass die Virusreplikation der Virushybride wesentlich schlechter ist als die der Typ 5 Adenoviren (*d/309:WtD=3-4*, *d/338:d/1520>10*). Desweiteren konnten wir mittels Western-Blot und RT-PCR zeigen, dass die E1A-Expression der Virushybride sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Typ 5 Viren deutlich beeinträchtigt ist.

Diese Unterschiede in der E1A-Expression zwischen Typ 5 Adenoviren und Typ 2 / Typ 5 Virushybriden bieten eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede im Virusertrag und sollten bei der Konstruktion neuer erfolgreicher therapeutischer Adenoviren sowie für Untersuchungen zur viralen Transformation berücksichtigt werden.



## 7.2 Einleitung

Adenoviren wurden erstmalig als ein für akute Atemwegsinfektionen ursächliches Agens 1953 und 1954 von zwei Arbeitsgruppen isoliert und charakterisiert (Hilleman and Werner, 1954; Rowe et al., 1953). 1956 bekamen sie nach dem Gewebe aus dem sie ursprünglich isoliert wurden (adenoides Gewebe) den Namen Adenoviren (Enders et al., 1956). Neben respiratorischen Krankheiten verursachen Adenoviren die epidemische Konjunktivitis (Jawetz, 1959) und sind mit weiteren klinischen Syndromen, wie z.B. der infantilen Gastroenteritis (Flewett et al., 1973) assoziiert. Die Familie der Adenoviridae setzt sich aus den Genera *Mastadenovirus* (Virusspezies der Säugetiere) und *Aviadenovirus* (Virusspezies der Vögel) zusammen (Norrby et al., 1976). Bisher werden insgesamt 47 humane Adenovirus Serotypen unterschieden, die entsprechend ihrer Fähigkeit, rote Blutzellen zu agglutinieren (Hämagglutination), in sechs Subgenera (A-F) eingeteilt werden (Hierholzer, 1973; Hierholzer et al., 1988; Rosen, 1960). 1976 konnten Trentin *et al.* zeigen, dass das humane Adenovirus Typ 12 nach Inokulation in neugeborene Hamster die Bildung von malignen Tumoren induziert (Trentin et al., 1962). Die Möglichkeit, Tumoren in Nagern zu induzieren und kultivierte Zellen zu transformieren, machten Adenoviren zu einem wichtigen Modellsystem zur Erforschung der Onkogenese. Heute wird an der Entwicklung von rekombinanten Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie und an der Entwicklung onkolytischer Adenoviren gearbeitet (Dobbelstein, 2004; Shenk, 2001).

Adenoviren sind 70-100nm große ikosaedrische Kapside ohne Membranhülle, in deren Inneren sich der Nukleokapsidkomplex befindet. Das lineare doppelsträngige DNA-Genom hat eine Länge von 36.000-38.000bp. Beide DNA-Stränge kodieren für Proteine. Das Genom besteht aus den kodierenden Bereichen für die während des Replikationszyklus früh exprimierten regulatorischen Proteine der E1-E4 Gene und der spät exprimierten Gene für die Strukturproteine (L) (Shenk, 2001). Die sehr früh während der Virusreplikation exprimierten E1A- und E1B-Gene werden unabhängig von einem anderen viralen Faktor transkribiert. Durch differentielles Spleißen der Vorläufer-RNA werden während der frühen Infektionsphase hauptsächlich zwei unterschiedlich große E1A-Proteine synthetisiert (289 AS und 243 AS), während des gesamten Infektionszyklus sind es fünf. E1A transaktiviert die Transkription der E2-, E3- und E4-Gene, sowie einiger zellulärer Gene. Dabei bindet es nicht direkt an die DNA, sondern an zelluläre Transkriptionsfaktoren, die wiederum an die viralen Promotoren binden. E1A ist damit essentiell für die Virusreplikation. Desweiteren kann E1A unterschiedlichste biologische Aktivitäten in den infizierten Zellen ausüben (Frisch and Mymryk, 2002). Betrachtet man sich die E1B-Region, so werden hauptsächlich zwei Proteine exprimiert, E1B-55kDa und E1B-19kDa. E1B-55kDa ist in der Lage, an den Tumorsuppressor p53 zu binden und ihn zu inaktivieren. Die Interaktion von E1B-55kDa und E4-34kDa führt in diesem Zusammenhang zu einem schnellen Umsatz von p53. Desweiteren fördert E1B-

55kDa im Komplex mit E4-34kDa den Export viraler mRNA aus dem Zellkern, während zelluläre mRNA dort verbleibt (*host cell shut down*). E1B-19kDa ist einer der stärksten bekannten Inhibitoren der Apoptose. E1A und E1B-55kDa sind zusammen ausreichend, um primäre Nagerzellen zu transformieren.

Die meisten Untersuchungen wurden an Adenoviren der Serotypen 2 (Ad2) und 5 (Ad5) durchgeführt. Beide Serotypen gehören zu dem Subgenus C, innerhalb dessen eine DNA-Homologie von 99-100% vorliegt. Beide Serotypen dienten auch als Grundlage zur Herstellung rekombinanter onkolytischer Adenoviren. Diese wurden mit der Strategie, die Adenovirusreplikation selektiv in Tumorzellen zu gewährleisten und dadurch Tumorzellen aufgrund des zytopathischen Effekts der Virusreplikation zu entfernen, für den Einsatz in der experimentellen Krebstherapie weiterentwickelt (Dobbelstein, 2004). Da in früheren Studien Ad2 und Ad5 kaum unterschieden wurden, sind viele therapeutische Viren Hybride beider Serotypen. Meist wurde für die Herstellung dieser Viren eine homologe Rekombination zwischen einem von Ad2-abgeleiteten Plasmid, das die erzielte Veränderung der DNA enthielt, und einem Ad5-Virusgenom durchgeführt. Das so entstandene erste rekombinante onkolytische Adenovirus *d/1520/Onyx015* kodiert für eine von Ad2-abgeleitete E1-Region, während der Rest des Genoms der Ad5-Sequenz entspricht (Barker and Berk, 1987). *d/1520*, so wurde anfänglich vermutet, repliziert sich selektiv in Tumorzellen, da die Expression des viralen Onkoproteins und p53-Antagonisten E1B-55kDa aufgrund einer Deletion innerhalb der E1-Region verhindert wird (Bischoff et al., 1996). In den folgenden Jahren wurde das Konzept der Tumorselektivität in Abhängigkeit vom p53-Status der infizierten Zellen intensiv untersucht, diskutiert (Dix et al., 2001; Dobbelstein, 2004; Goodrum and Ornelles, 1998; Hall et al., 1998; Harada and Berk, 1999; Hobom and Dobbelstein, 2004; Kirn, 2001; Koch et al., 2001; Rothmann et al., 1998; Turnell et al., 1999) und letztendlich dahingehend modifiziert, dass der Verlust von E1B-55kDa hauptsächlich den späten Export viraler RNA negativ beeinflusst. D.h., *d/1520* repliziert sich selektiv in Tumorzellen, die dem Virus eine entsprechende RNA-Export-Funktion bieten (O'Shea et al., 2004). Der Tatsache, dass die E1-Region von *d/1520* von Ad2 abgeleitet worden ist, während der Rest des Genoms Ad5 entspricht, wurde bis heute keine Bedeutung geschenkt. So wurden Studien, die die Funktion einer E1B-55kDa-Deletion bei der tumorspezifischen Adenovirusreplikation untersuchten, einerseits mit dem Virushybrid *d/1520* (Bischoff et al., 1996; Harada and Berk, 1999), andererseits aber auch mit *d/338* (Pilder et al., 1986), einem rein auf Ad5 basierenden Virus mit einer ähnlichen Deletion, durchgeführt (Goodrum and Ornelles, 1997; Goodrum and Ornelles, 1998; Goodrum and Ornelles, 1999; Hobom and Dobbelstein, 2004). Obwohl in der initialen Beschreibung von *d/1520* (Barker and Berk, 1987) ein partieller Defekt der E1A Expression beobachtet worden ist, wurde dies nicht weiter untersucht. *d/1520* und *d/338* werden als funktionell vergleichbare Virusmutanten betrachtet.

### 7.2.1 Fragestellung

Ziel des Projektes war es, die Replikation eines *wt* Ad2/Ad5-Virushybrides mit einem *wt* Ad5-Virus sowie entsprechende E1B-55kDa-Deletionsmutanten in Tumorzellen zu untersuchen. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob und inwiefern sich die Replikation von Virushybriden und Ad5-Viren unterscheidet.

## 7.3 Material & Methoden

### 7.3.1 Zellen

NCI-H1299	humanes Großzellen Lungenkarzinom, ATCC® Nr.: CRL-5803 <sup>TM</sup>
A549	humane kleine Lungenkarzinomzellen, ATCC® Nr.: CCL-185 <sup>TM</sup>
HER-911	Adenovirus E1 transformierte humane endotheliale Retinazellen (Fallaux et al., 1996)

NCI-H1299, A549 und HER-911 Zellen werden in D-MEM Vollmedium mit 25 mM HEPES-Puffer und 10% FCS (weitere Zusätze: L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Tetracyclin und Ciprobay) kultiviert (3.11, 4.1.2).

### 7.3.2 Viren

d/309	(Jones and Shenk, 1979)
d/338	(Logan et al., 1984)
WtD	(Barker and Berk, 1987)
d/1520	(Barker and Berk, 1987)

### 7.3.3 Virusinfektion

Eukaryotische Zellen einer definierten Zellzahl werden mit einer definierten Anzahl infektiöser Partikel infiziert. Dazu werden die Viren in D-MEM (ohne Zusätze) auf die Zellen gegeben und 3h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach wird das Medium entfernt und durch Vollmedium ersetzt.

#### 7.3.4 Virusaufzucht

Um eine Adenoviruslösung mit einem hohen Virustiter zu erhalten, werden Ad E1-transformierte 911-Zellen mit einer m.o.i. (multiplicity of infection) von 5 infiziert (7.3.3). 72h p.i. (post infection) werden die Zellen im Medium abgeschabt, bei 800UpM für 10min pelletiert und in PBS<sub>def.</sub> resuspendiert. Die Virusfreisetzung aus den infizierten Zellen erfolgt durch dreimaliges Einfrieren (in flüssigem Stickstoff) und Auftauen der Suspension. Im Anschluss werden vorhandene Zelltrümmer durch zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000UpM entfernt. Die Viruslösung wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

#### 7.3.5 Replikationsvergleich

Eukaryotische Zellen werden mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert, 72h p.i. geerntet und aufgeschlossen (7.3.3, 7.3.4). Danach wird der Titer der Viruslösung bestimmt (7.3.6). Der Virusertrag ist der Quotient aus der Anzahl der ursprünglich infizierten Zellen und der Gesamtzahl der Nachkommenviren.

#### 7.3.6 Virustitration

Der Virustiter wird durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung (4.3.4) infizierter Zellen bestimmt. Dabei wird die Anzahl von infektiösen Partikeln in der Einheit f.f.u. (fluorescence forming units) pro ml der Viruslösung ermittelt. Grundlage der Bestimmung ist die Synthese des adenoviralen E2A-Proteins. Da die E1A-Expression für die Virusreplikation essentiell ist, werden die Viren auf E1-transformierten 911-Zellen getitert. Dadurch sollen mögliche Einflüsse unterschiedlicher E1A-Expression der einzelnen Viren ausgeschlossen werden. Je 50.000 911-Zellen werden in einem 4 Well Objektträger mit 10µl und 1µl einer 1:100er, und 10µl und 1µl einer 1:10.000er Verdünnung der Viruslösung in PBS<sub>def.</sub> infiziert (7.3.3). 18-24h p.i. werden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit einem E2A-spezifischen Erstantikörper und einem Alexa Fluor® 594-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die anschließende DAPI-Färbung dient zur Visualisierung der Zellkerne und damit zur Bestimmung der Gesamtzellzahl. Ausgezählt wird später die Kammer des Objektträgers, in der zwischen 3 und 30% der Zellen infiziert sind. Über den Anteil der E2A-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl, die Menge der verwendeten Viruslösung und die Verdünnung der Viruslösung lässt sich der Titer errechnen (f.f.u./ml).

### 7.3.6.1 Antikörper für die Virustitration

$\alpha$ -Adenovirus 5 E2A, Maus monoklonal (B6-8) (Reich et al., 1983)

Alexa Fluor® 594 (Rot) Ziege  $\alpha$ -Maus IgG<sub>1</sub>     Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 7.3.7 Auftrennung und Visualisierung von Proteinen

Die Zellen werden geerntet, lysiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.3.2.1). Danach wird ein WB durchgeführt. Die Proteine werden auf eine NC-Membran übertragen und mit spezifischen Erstantikörpern inkubiert. Diese werden wiederum durch POD-gekoppelte Zweitantikörper visualisiert (4.3.2.2).

#### 7.3.7.1 Antikörper für den WB

$\alpha$ - $\beta$ -Actin (AC-15), Maus monoklonal     Abcam plc, Cambridge, UK

$\alpha$ -Adenovirus 2 E1A, Maus monoklonal (M73) Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts.

Ziege  $\alpha$ -Maus IgG, F(ab')<sub>2</sub>-Fragment,     Dianova GmbH, Hamburg  
POD-gekoppelt

### 7.3.8 RNA Isolierung

Die Zellen werden zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und in 1ml TRIZOL® Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) geerntet. Anschliessend wird die RNA laut Herstellerprotokoll isoliert. Durch die Behandlung der Zellen mit TRIZOL® Reagent wird die Gesamt-RNA der Zellen isoliert. Anhand der ribosomalen RNA (28S rRNA, 18S rRNA, 5,8S rRNA, 5S rRNA) kann die Qualität der Präparation kontrolliert werden. Zuerst wird die Nukleinsäurekonzentration der Lösung ermittelt (4.2.4). Danach werden 300ng Gesamt-RNA auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (4.2.5.1). Unter UV-Licht zeichnen sich die Banden der ribosomalen RNA deutlich ab.

### 7.3.9 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wird mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) laut Herstellerprotokoll isoliert. Im Anschluss wird die Nukleinsäurekonzentration ermittelt (4.2.4).

### 7.3.10 Semiquantitative RT-PCR

#### Reverse Transkription

Da eukaryotische Gene aus Introns und Exons bestehen, ist es je nach der Wahl der Oligonukleotide für die RT-PCR möglich, zwischen PCR-Fragmenten, deren Matrize genomische DNA war und PCR-Fragmenten, die durch die Amplifikation von cDNA (revers transkribierter mRNA) entstanden sind, aufgrund ihres Laufverhaltens im Agarosegel zu unterscheiden. Die Kontamination einer RNA-Lösung durch genomische DNA wirkt sich später jedoch negativ auf die Effizienz der semiquantitativen PCR aus. Deshalb wird die Gesamt-RNA zunächst einem DNase I Verdau (Invitogen GmbH, Karlsruhe) laut Herstellerprotokoll unterzogen.

1µg DNase I verdaute Gesamt-RNA wird mit Hilfe eines spezifischen Oligonukleotides (RT-Primer) und dem Enzym SuperScript™ II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) laut Herstellerprotokoll revers transkribiert, d.h., in cDNA umgeschrieben.

#### PCR

Nach der reversen Transkription wird eine Stammlösung aus 2µl cDNA, spezifischen Oligonukleotiden (hin und rück Primer) und dem Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit einem Endvolumen von 50µl laut Herstellerprotokoll angesetzt und auf drei Reaktionsgefäße verteilt. Während der anschließenden PCR werden die Reaktionsgefäße zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils am Ende eines Replikationszyklus entnommen. Dabei ist das Ziel genügend DNA zu amplifizieren, um diese mit Ethidiumbromid anfärben zu können, ohne dass es zu einer Sättigung der Ethidiumbromidfärbung kommt. Die Amplifikate werden im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (4.2.4).

#### PCR Programme

##### E1A:

1x	96°C	3 min
25-35x	96°C	30 s
	59°C	30 s
	72°C	20 s
1x	8°C	Lagerung

##### Ubiquitin C:

1x	96°C	3 min
15-25x	96°C	30 s
	72°C	50 s
1x	8°C	Lagerung

**7.3.10.1 Oligonukleotide**

E1A RT	5' GGTGATGTCGGGCGTCTCAGG 3'
E1A hin (13S u. 12S mRNA)	5' GCGGTTTCGCAGATTTTCCCG 3'
E1A rück (13S u. 12S mRNA)	5' GCAGGCGCCATTTTAGGACG 3'
<i>Ubiquitin C</i> RT	5' ACTGGGCTCCACCTCAAGGGTGAT 3'
<i>Ubiquitin C</i> hin	5' GTCGCAGCCGGGATTTGGGTCGCG 3'
<i>Ubiquitin C</i> rück	5' GTCTTGCCAGTGAGTGTCTTCACG 3'

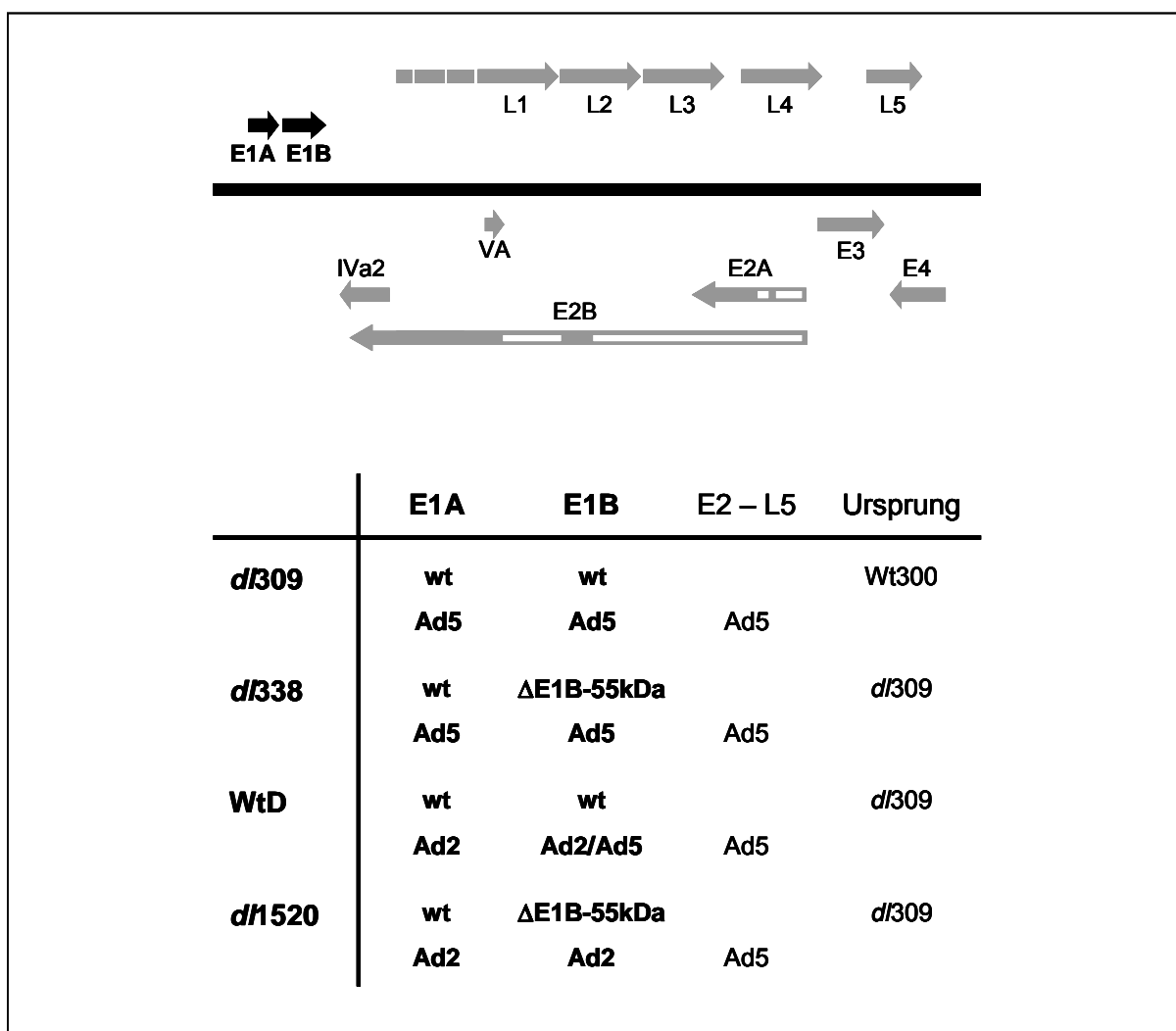
**7.3.11 Semiquantitative PCR**

Für die semiquantitative PCR werden 1µg genomische DNA oder 5ng Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgt wie in Kapitel 7.3.10 (PCR) beschrieben.

**7.4 Ergebnisse**

Um die Replikation von einem *wt* Ad2/Ad5-Virus hybrid mit einem *wt* Ad5-Virus sowie entsprechende E1B-55kDa-Deletionsmutanten zu vergleichen, wurde die Virusreplikation von WtD und *d/309* bzw. von *d/1520* und *d/338* in H1299- und A549-Zellen analysiert. *d/309* (Jones and Shenk, 1979) ist aus dem Virus H5wt300 hergestellt worden und enthält nur eine *Xba*I Schnittstelle, die bei 3,8 map units lokalisiert ist (1.339bp vom linken Ende des Genoms) (Pilder et al., 1986). Damit fehlt dem Virus das 5' Ende der E3-Region. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Region für die Virusreplikation *in vitro* nicht essentiell ist (Bett et al., 1995). *d/309* fungierte in unserer Studie als *wt* Ad5. Ad5 *d/338* (Logan et al., 1984) enthält eine 524bp Deletion in der E1B Region zwischen den Nukleotidsequenzpositionen 2.805-3.329. Damit exprimiert das Virus kein E1B-55kDa. Während die Expression von E1B-19kDa unverändert war, konnte E1B-55kDa im WB nicht nachgewiesen werden (Pilder et al., 1986). Die Virusmutante *d/1520* (Barker and Berk, 1987) ist *in vivo* mittels homologer Rekombination in 293-Zellen hergestellt worden. Dazu wurde *Xba*I-geschnittene genomische *d/309*-DNA zusammen mit *Hind*III-geschnittener *pd/1520*-Plasmid-DNA in 293-Zellen kotransfiziert. Das Plasmid *pd/1520* enthielt genomische Ad2-DNA von Nukleotidposition 1-6.228 und trug zwei E1B-Mutationen: Die Punktmutation pm2022 führt zur Termination der Translation von E1B-55kDa. Die Deletion zwischen der *Pst*I-Schnittstelle an Position 2.496 und der *Bgl*II-Schnittstelle an Position 3.323, sowie die Insertion einer kurzen Linkersequenz resultiert in einer Verschiebung des Leserahmens.

Dadurch wird ein zweites STOP-Kodon an Position 3.336 generiert. Während nach *d/1520*-Infektion E1B-55kDa im WB nicht mehr nachweisbar war, wurden von E1B-19kDa reduzierte Levels nachgewiesen. WtD (Barker and Berk, 1987) ist ebenfalls nach Transfektion von genomischer *d/309*-DNA und *pd/1520* durch homologe Rekombination entstanden. Das Virus kodiert jedoch für die von *pd/1520* abgeleitete E1A-Region. Die E1B-Region ist dagegen von *d/309* abgeleitet und enthält keine Mutationen. WtD fungierte in unserer Studie als *wt* Ad2/Ad5-Hybrid. Die Viren wurden expandiert (7.3.4) und die Titer der Viruslösungen mittels Immunfluoreszenzanalyse bestimmt (7.3.6).

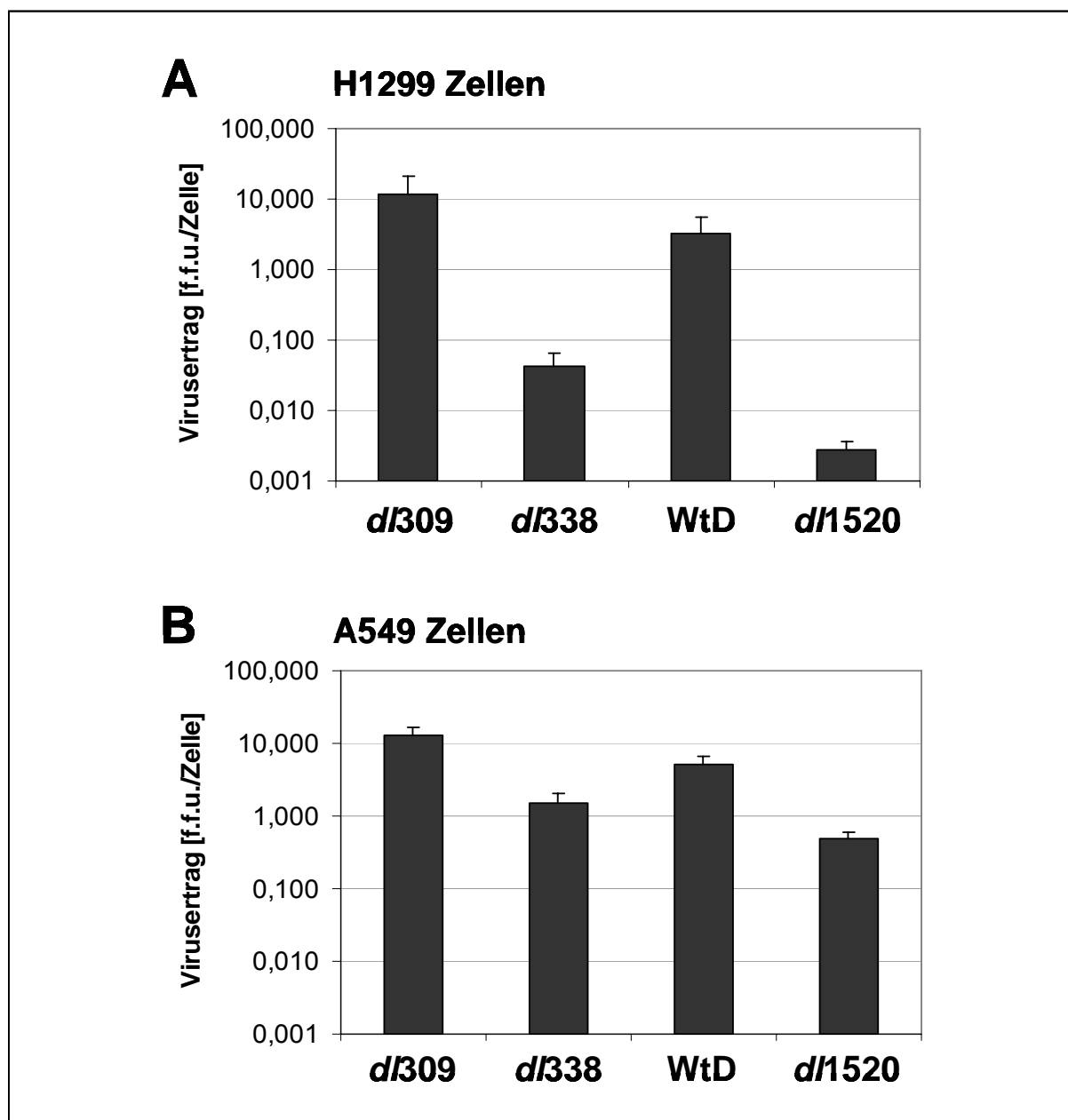


**Abbildung 26: Schematische Darstellung der untersuchten Virusgenome.**

Im oberen Teil der Abbildung ist das Adenovirusgenom von Ad2 und Ad5 zusammen mit dessen bedeutendsten mRNA-Abkömmlingen skizziert. Die E1A- und E1B-Region, die sich bei den Viren *d/309* und WtD bzw. *d/338* und *d/1520* unterscheiden, sind durch einen hervorgehobenen Pfeil gekennzeichnet. In der Tabelle im unteren Teil der Abbildung sind die entsprechenden kodierenden Regionen und deren Ursprung genauer charakterisiert. Allen Viren fehlt das 5' Ende der E3-Region, das für die Replikation *in vitro* jedoch nicht essentiell ist (Bett et al., 1995).



Subkonfluente H1299- und A549-Zellen wurden mit den Viren *d/309*, *d/338*, WtD und *d/1520* mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. 72h p.i. wurden die Zellen geerntet und pelletiert. Die Zellpellets wurden anschließend in PBS<sub>def.</sub> aufgenommen und aufgeschossen. Der Virusertrag wurde durch Titration der so gewonnenen Viruslösung mittels Immunfluoreszenzanalyse auf 911-Zellen bestimmt (7.3.5).



**Abbildung 27: Untersuchung der Adenovirusreplikation in Abhängigkeit von der E1-Region.**

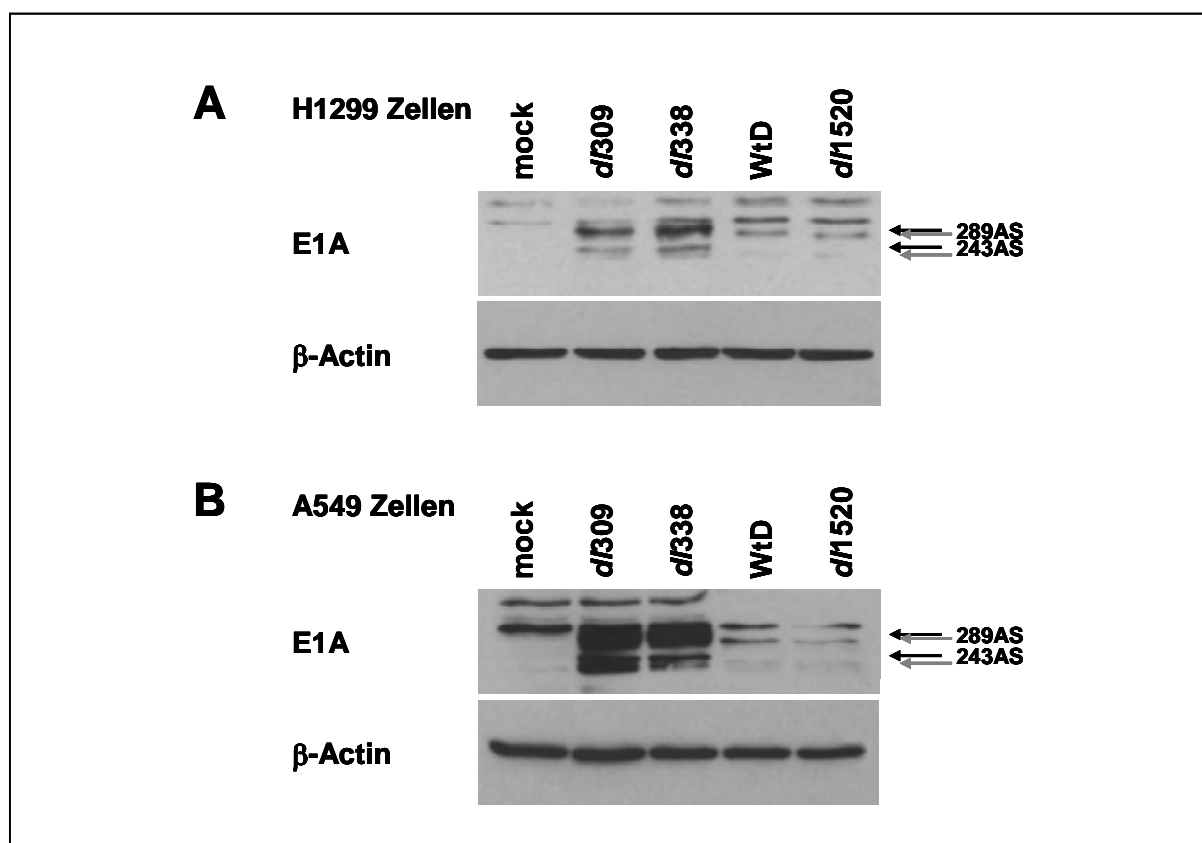
$1,0 \times 10^5$  H1299-Zellen (A) bzw.  $7,5 \times 10^4$  A549-Zellen (B) wurden mit den Adenoviren *d/309*, *d/338*, WtD und *d/1520* mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Zellen wurden 72h p.i. geerntet und in PBS<sub>def.</sub> aufgeschossen. Mittels Immunfluoreszenzanalyse der viralen E2A-Expression in 911-Zellen wurde der Virusertrag als f.f.u./Zelle bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Wie durch frühere Studien zu erwarten war (Harada and Berk, 1999), replizieren sich Viren, die das E1B-55kDa Protein nicht mehr synthetisieren, mit einem geringeren Virusertrag als *wt* Viren (Abbildung 27). In H1299-Zellen konnten wir zudem beobachten, dass sich das *wt* Ad2/Ad5 Hybrid WtD mit etwa 4-fach geringerer Effizienz als *wt* Ad5 *d/309* repliziert. Besonders stark ist der Unterschied zwischen dem E1B-55kDa-defizienten Virushybrid *d/1520* und Ad5 *d/338*. Obwohl beide Viren eine vergleichbare Veränderung tragen, repliziert sich das Virushybrid mit mehr als 1 log-Stufe geringerer Effizienz als das entsprechende Ad5 Virus (Abbildung 27A). In A549-Zellen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, allerdings mit geringeren Unterschieden im Virusertrag (Abbildung 27B). So replizieren sich die E1B-55kDa-Deletionsmutanten mit etwa 1 log-Stufe geringerem Virusertrag als die entsprechenden *wt* Viren. Das *wt* Virushybrid WtD repliziert sich mit 2,4-fach geringerer Effizienz als Ad5 *d/309*. Betrachtet man die Virusmutanten, so repliziert sich *d/1520* mit 3,1-fach geringerer Effizienz als Ad5 *d/338*.

Demzufolge replizieren sich Ad2/Ad5 Virushybride, deren E1-Region von Ad2-abgeleitet worden ist, weniger effizient als vollständig Ad5-basierte Viren.

Der einzige ersichtliche Unterschied zwischen den Virushybriden und Ad5 ist in der E1-Region zu finden (Abbildung 26), im Ursprung der E1A- und E1B-Gensequenz. Die Virusmutanten *d/1520* und *d/338*, die das E1B-55kDa Protein nicht mehr exprimieren, unterscheiden sich zusätzlich im Expressionslevel des E1B-19kDa Proteins (Barker and Berk, 1987; Pilder et al., 1986). Für die Unterschiede im Virusertrag können dementsprechend nur das E1A-Gen oder das E1B-19kDa-Gen verantwortlich gemacht werden. E1B-19kDa inhibiert hauptsächlich die Apoptose (White et al., 1992). Unter den infizierten H1299- und A549-Zellen konnten wir jedoch keine apoptotischen Zellen erkennen. Die Zellen wiesen morphologisch keine Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt). E1A ist dagegen für die Replikation in den meisten analysierten Assaysystemen essentiell (Shenk, 2001). Aus diesem Grund haben wir im Folgenden die E1A-Expression der Viren untersucht.

Dazu wurden subkonfluente H1299- und A549-Zellen mit den Viren *d/309*, *d/338*, WtD und *d/1520* mit einer m.o.i. von 1 infiziert. Die Zellen wurden 10h p.i. geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Expression der E1A-Proteine (289 AS und 243 AS) wurde mittels WB analysiert (7.3.7). Zur Kontrolle gleicher Proteinmengen wurde das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zuerst mit einem AK gegen E1A gefärbt, gestrippt und anschließend mit einem AK gegen  $\beta$ -Actin nachgefärbt. Betrachtet man das Ergebnis in Abbildung 28 so fällt auf, dass sowohl in H1299-Zellen als auch in A549-Zellen die Ad2/Ad5-Virushybride deutlich weniger E1A synthetisieren als die von Ad5 abgeleiteten Viren. Anhand der  $\beta$ -Actin-Färbung ist zu erkennen, dass vergleichbare Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden.

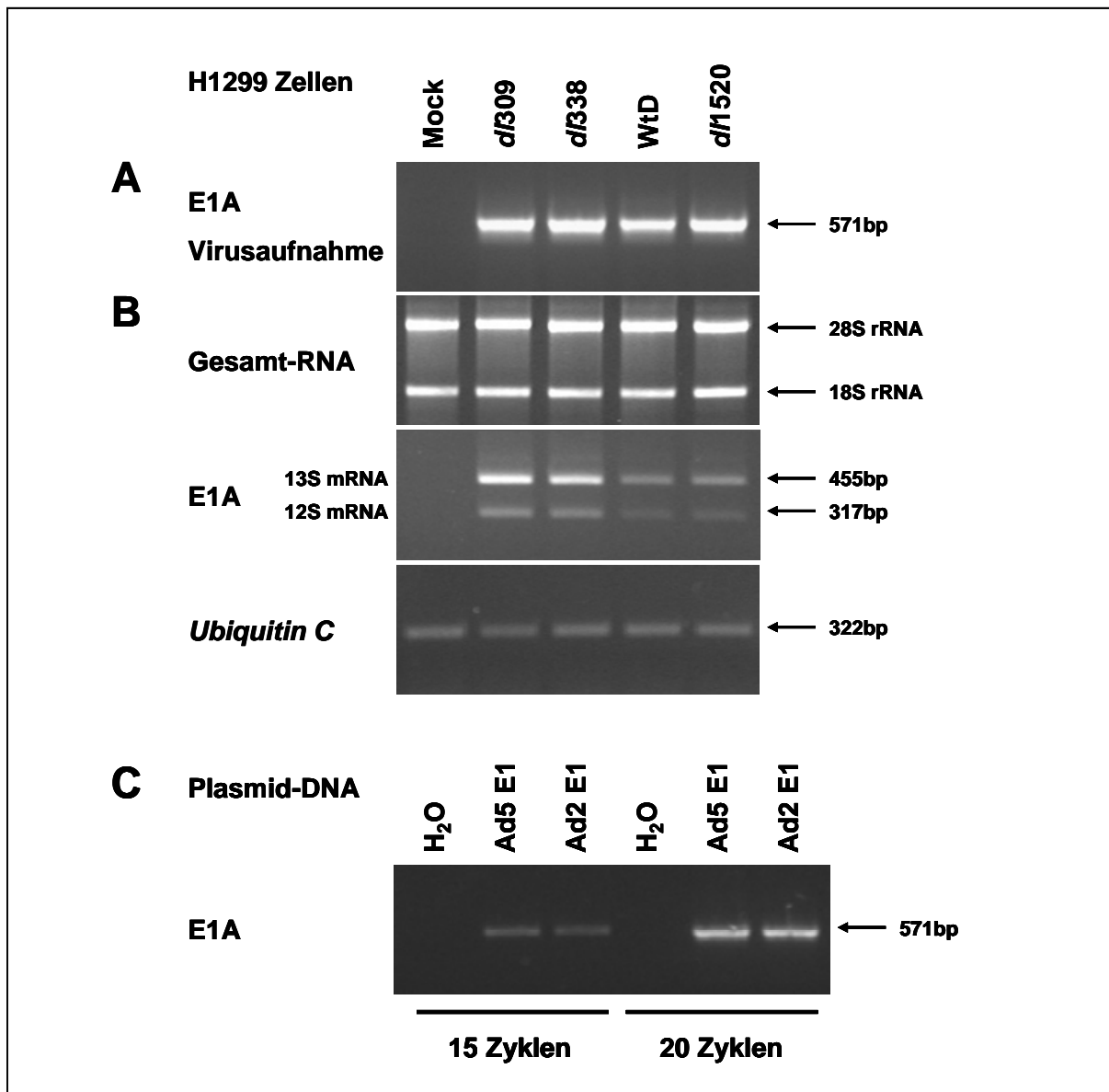


**Abbildung 28: Untersuchung der E1A Proteinexpression.**

1,0x10<sup>5</sup> H1299-Zellen (**A**) bzw. 7,5x10<sup>4</sup> A549-Zellen (**B**) wurden mit den Adenoviren *d/309*, *d/338*, WtD und *d/1520* mit einer m.o.i. von 1 infiziert. Die Zellen wurden 10h p.i. geerntet und lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran übertragen. Die Expression der 289 AS- und 243 AS-E1A-Proteine wurde mit spezifischen AK nachgewiesen. Eine β-Actin-Färbung wurde zum Nachweis gleicher Proteinmengen der Lysate durchgeführt. Dazu wurden die NC-Membranen zuerst mit einem AK gegen E1A gefärbt, gestrippt und anschließend mit einem AK gegen β-Actin nachgefärbt.

Um zu untersuchen, ob die zwischen Ad2/Ad5 und Ad5 Viren beobachteten Unterschiede in der E1A-Expression bereits auf transkriptioneller Ebene begründet liegen, wurde die Synthese der viralen E1A-mRNAs (13S mRNA und 12S mRNA) mittels RT-PCR untersucht.

Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit den Viren *d/309*, *d/338*, WtD und *d/1520* mit einer m.o.i. von 1 infiziert und 8h p.i. geerntet. Die zelluläre RNA (Gesamt-RNA) wurde mittels TRIZOL® Reagent isoliert und gleiche Mengen RNA wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (7.3.8). Im Anschluss daran wurde eine semiquantitative RT-PCR mit E1A-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (7.3.10). Als interne Kontrolle wurde zusätzlich die Expression der zellulären *Ubiquitin C* mRNA analysiert. Um die Aufnahme der vier Viren in die Zelle zu kontrollieren, wurden H1299-Zellen mit den beschriebenen Viren mit einer m.o.i. von 50 infiziert und 4h p.i. geerntet. Aus diesen Zellen wurde genomische DNA isoliert (7.3.9) und eine semiquantitative PCR zum Nachweis genomischer adenoviraler DNA durchgeführt (7.3.11). Dazu wurden ebenfalls die E1A-spezifischen Oligonukleotide verwendet.



**Abbildung 29: Untersuchung der E1A Transkription.**

(A)  $1,0 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden mit den Adenoviren *d/309*, *d/338*, WtD und *d/1520* mit einer m.o.i. von 50 infiziert. Die Zellen wurden 4h p.i. geerntet und genomische DNA wurde isoliert. Je  $1 \mu\text{g}$  genomische DNA wurde in einer semiquantitativen PCR mit E1A-spezifischen Oligonukleotiden über 30 Zyklen amplifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. (B)  $1,0 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden mit den Adenoviren *d/309*, *d/338*, WtD und *d/1520* mit einer m.o.i. von 1 infiziert. 8h p.i. wurden die Zellen geerntet und die zelluläre Gesamt-RNA isoliert. Je  $300 \text{ ng}$  Gesamt-RNA wurde auf einem Agaraosegel aufgetrennt und analysiert. Ausgehend von  $1 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde eine semiquantitative RT-PCR mit E1A- bzw. *Ubiquitin C*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden nach 30 bzw. 20 Amplifikationszyklen mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. (C)  $5 \text{ ng}$  Ad5 bzw. Ad2 Plasmid-DNA wurde in einer semiquantitativen PCR mit E1A-spezifischen Oligonukleotiden über 15 und 20 Zyklen amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Eine Wasser-Kontrolle wurde mitgeführt.

Das amplifizierte PCR-Fragment, ausgehend von genomischer DNA, ist aufgrund der enthaltenen Intron-Sequenzen größer als das bei der RT-PCR amplifizierte Fragment. Um den Nachweis zu erbringen, dass die Effizienz der semiquantitativen PCR sowohl für Ad2 abgeleitete als auch für Ad5 abgeleitete DNA gleich ist, wurde eine semiquantitative PCR mit

Ad2 bzw. Ad5 Plasmid-DNA durchgeführt. Die Auswertung der semiquantitativen PCR erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Transkription der E1A mRNA der Ad2/Ad5 Virushybride ist im Vergleich zu Ad5 deutlich eingeschränkt (Abbildung 29B). Anhand der internen Kontrolle, dem Vergleich der *Ubiquitin C* mRNA-Levels, ist ersichtlich, dass gleiche Gesamt-RNA-Mengen verwendet wurden. Durch den semiquantitativen Nachweis intrazellulärer genomischer Virus-DNA konnten wir zeigen, dass die schwachen Ad2/Ad5 E1A mRNA-Levels nicht auf einer Beeinträchtigung der Virusaufnahme in die Zelle beruhen (Abbildung 29B). Desweiteren können Unterschiede in der Effizienz der PCR von Ad2- bzw. Ad5-Matrizen ausgeschlossen werden. Die Amplifikation von Ad2- bzw. Ad5-Plasmid-DNA erfolgte gleich gut (Abbildung 29C).

D. h., Ad2/Ad5 Virushybride, die die E1-Region von Ad2 enthalten, replizieren sich deutlich schlechter in Tumorzellen als Typ 5 Adenoviren. Es ist zu vermuten, dass die beobachteten Unterschiede in der E1A-Expression, die bereits auf Transkriptionsebene auftreten, die Ursache für den verminderten Virusertrag sind.

## 7.5 Diskussion

Die Transkription und Translation der E1A-Gene ist einer der ersten Schritte während des adenoviralen Replikationszyklus und essentiell für die Transaktivierung der weiteren adenoviralen Genexpression. Wir konnten zeigen, dass Viren, deren E1-Region von Ad2 abgeleitet worden ist, deutlich weniger E1A mRNA und Protein exprimieren als Viren mit einer Ad5 E1-Region. Diese Beobachtung konnten wir sowohl für *wt* Viren als auch für Viren mit einer Deletion innerhalb des E1B-55kDa-Gens machen. Aufgrund der Bedeutung der E1A-Expression innerhalb des Replikationszyklus schlussfolgern wir, dass die eingeschränkte E1A-Expression die Ursache für die geringe Produktivität der Replikation der Virushybride ist.

Unterschiede auf Ebene der Transkription können auf der mRNA Syntheserate, z.B. durch differentielle Chromatinassoziation, oder auf der mRNA-Stabilität beruhen. Letzteres bleibt zu untersuchen. Nach transienter Transfektion von DNA-Fragmenten der Ad2 bzw. Ad5 E1A-Region (Nukleotide 110-1.711) konnte kein Unterschied der E1A-Proteinexpression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass eine abgelegene regulatorische Region des Virusgenoms und/oder der Kontext einer Virusinfektion zur Regulation der E1A-Expression beiträgt. Letzteres könnte beispielsweise über Signaltransduktionswege geschehen, die durch die Virusadhäsion und den Eintritt der Viren in die Zelle induziert werden (Greber, 2002). Die in H1299- und A549-Zellen beobachteten Unterschiede in der Effizienz der Virusreplikation zeigen den Einfluss zellulärer Faktoren auf

die Replikation. In beiden Zelllinien ist die Ad2 E1A-Expression deutlich eingeschränkt, die Virusreplikation der Virushybride ist davon jedoch in A549-Zellen nur schwach betroffen.

Für die Herstellung effektiver therapeutischer Viren sollten die Unterschiede zwischen Ad2- und Ad5-E1A-Expression und die Unterschiede im Virusertrag in Betracht gezogen werden. Während in klinischen Studien der Phasen I und II mit dem Virushybrid *d/1520/Onyx015* vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden (Kirn, 2001), bleiben Berichte über erfolgreiche fortgeschrittene Studien aus. Eine ineffiziente Virusreplikation ist ein möglicher Grund dafür. Viren, die sich schlecht vermehren, sind nicht als onkolytische Viren zu gebrauchen, da sie nicht genügend Tumorzellen entfernen können (Dobbelstein, 2004). Die im Vergleich zu Ad5 eingeschränkte E1A-Expression von *d/1520* könnte ein Grund dafür sein, wahrscheinlich aber nicht der einzige. Ähnliche Erwägungen sollten auch bei dem Gebrauch von Adenoviren in Transformationsassays angesetzt werden. Bei Untersuchungen zur Ermittlung des onkogenen Potentials von Ad2 und Ad5 sollte beachtet werden, dass entgegen der hohen Sequenzhomologie beider Serotypen deutliche Unterschiede in der Genexpression vorliegen können.

Unsere Ergebnisse geben Anlass dafür, dass Adenoviren der Serotypen 2 und 5, insbesondere Hybride beider Serotypen, sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der angewandten Forschung zur Entwicklung experimenteller Therapien sorgfältig unterschieden werden sollten.

## 8 Literatur

- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R. and Hoschuetzky, H. (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*, **107** ( Pt 12), 3655-3663.
- Adachi, S., Jigami, T., Yasui, T., Nakano, T., Ohwada, S., Omori, Y., Sugano, S., Ohkawara, B., Shibuya, H., Nakamura, T. and Akiyama, T. (2004) Role of a BCL9-related beta-catenin-binding protein, B9L, in tumorigenesis induced by aberrant activation of Wnt signaling. *Cancer Res*, **64**, 8496-8501.
- Agami, R., Blandino, G., Oren, M. and Shaul, Y. (1999) Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature*, **399**, 809-813.
- Andl, T., Reddy, S.T., Gaddapara, T. and Millar, S.E. (2002) WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell*, **2**, 643-653.
- Aqeilan, R.I., Pekarsky, Y., Herrero, J.J., Palamarchuk, A., Letofsky, J., Druck, T., Trapasso, F., Han, S.Y., Melino, G., Huebner, K. and Croce, C.M. (2004) Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4401-4406.
- Augustin, M., Bamberger, C., Paul, D. and Schmale, H. (1998) Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mamm Genome*, **9**, 899-902.
- Bakkers, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M. and Hammerschmidt, M. (2002) Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev Cell*, **2**, 617-627.
- Barbieri, C.E. and Pietenpol, J.A. (2006) p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res*, **312**, 695-706.
- Barker, D.D. and Berk, A.J. (1987) Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology*, **156**, 107-121.
- Barker, N. and Clevers, H. (2000) Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays*, **22**, 961-965.
- Barth, A.I., Pollack, A.L., Altschuler, Y., Mostov, K.E. and Nelson, W.J. (1997) NH2-terminal deletion of beta-catenin results in stable colocalization of mutant beta-catenin with adenomatous polyposis coli protein and altered MDCK cell adhesion. *J Cell Biol*, **136**, 693-706.
- Behrens, J., Jerchow, B.A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, **280**, 596-599.
- Behrens, J. and Lustig, B. (2004) The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol*, **48**, 477-487.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638-642.
- Bett, A.J., Krougliak, V. and Graham, F.L. (1995) DNA sequence of the deletion/insertion in early region 3 of Ad5 dl309. *Virus Res*, **39**, 75-82.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. and McCormick, F. (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.

- Blandino, G. and Dobbelstein, M. (2004) p73 and p63: why do we still need them? *Cell Cycle*, **3**, 886-894.
- Bode, A.M. and Dong, Z. (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **4**, 793-805.
- Boon, E.M., van der Neut, R., van de Wetering, M., Clevers, H. and Pals, S.T. (2002) Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res*, **62**, 5126-5128.
- Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K. and Lifton, R.P. (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*, **346**, 1513-1521.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F. and Kirchner, T. (1999) beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*, **155**, 1033-1038.
- Braithwaite, A.W., Del Sal, G. and Lu, X. (2006) Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ*, **13**, 984-993.
- Brantjes, H., Barker, N., van Es, J. and Clevers, H. (2002) TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol Chem*, **383**, 255-261.
- Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M. and Clevers, H. (2001) All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1410-1419.
- Bruhn, L., Munnerlyn, A. and Grosschedl, R. (1997) ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev*, **11**, 640-653.
- Brunori, M., Malerba, M., Kashiwazaki, H. and Iggo, R. (2001) Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway. *J Virol*, **75**, 2857-2865.
- Cagatay, T. and Ozturk, M. (2002) P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene*, **21**, 7971-7980.
- Calabro, V., Mansueto, G., Parisi, T., Vivo, M., Calogero, R.A. and La Mantia, G. (2002) The human MDM2 oncoprotein increases the transcriptional activity and the protein level of the p53 homolog p63. *J Biol Chem*, **277**, 2674-2681.
- Caricasole, A., Copani, A., Caraci, F., Aronica, E., Rozemuller, A.J., Caruso, A., Storto, M., Gavrighi, G., Terstappen, G.C. and Nicoletti, F. (2004) Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci*, **24**, 6021-6027.
- Carmichael, J., Sugars, K.L., Bao, Y.P. and Rubinsztein, D.C. (2002) Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem*, **277**, 33791-33798.
- Carr, A.M. (2000) Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science*, **287**, 1765-1766.
- Celli, J., Duijf, P., Hamel, B.C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A.P., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R.C., Van Buggenhout, G., van Haeringen, A., Woods, C.G., van Essen, A.J., de Waal, R., Vriend, G., Haber, D.A., Yang, A., McKeon, F., Brunner, H.G. and van Bokhoven, H. (1999) Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*, **99**, 143-153.
- Chen, X. (1999) The p53 family: same response, different signals? *Mol Med Today*, **5**, 387-392.
- Chi, S.W., Ayed, A. and Arrowsmith, C.H. (1999) Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *Embo J*, **18**, 4438-4445.



- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
- Choi, H.R., Batsakis, J.G., Zhan, F., Sturgis, E., Luna, M.A. and El-Naggar, A.K. (2002) Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. *Hum Pathol*, **33**, 158-164.
- Chu, E.Y., Hens, J., Andl, T., Kairo, A., Yamaguchi, T.P., Briskin, C., Glick, A., Wysolmerski, J.J. and Millar, S.E. (2004) Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development*, **131**, 4819-4829.
- Cicero, D.O., Falconi, M., Candi, E., Mele, S., Cadot, B., Di Venere, A., Rufini, S., Melino, G. and Desideri, A. (2006) NMR structure of the p63 SAM domain and dynamical properties of G534V and T537P pathological mutants, identified in the AEC syndrome. *Cell Biochem Biophys*, **44**, 475-489.
- Cohen, G.B., Ren, R. and Baltimore, D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, **80**, 237-248.
- Conacci-Sorrell, M.E., Ben-Yedidia, T., Shtutman, M., Feinstein, E., Einat, P. and Ben-Ze'ev, A. (2002) Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev*, **16**, 2058-2072.
- Cong, F. and Varmus, H. (2004) Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2882-2887.
- Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P. and Matrisian, L.M. (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, **18**, 2883-2891.
- Cui, R., He, J., Mei, R., de Fromental, C.C., Martel-Planche, G., Taniere, P. and Hainaut, P. (2005) Expression of p53, p63, and p73 isoforms in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of esophagus. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C. and Pearl, L.H. (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, **105**, 721-732.
- Danielian, P.S. and McMahon, A.P. (1996) Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature*, **383**, 332-334.
- Davison, T.S., Yin, P., Nie, E., Kay, C. and Arrowsmith, C.H. (1998) Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome. *Oncogene*, **17**, 651-656.
- Dix, B.R., Edwards, S.J. and Braithwaite, A.W. (2001) Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol*, **75**, 5443-5447.
- Dobbelstein, M. (2004) Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*, **273**, 291-334.
- Dohn, M., Zhang, S. and Chen, X. (2001) p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*, **20**, 3193-3205.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S. and Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, **356**, 215-221.
- Drewelus, I. (2005) Die ISGylierung des Tumorsuppressors p53 und seines Homologs p63. *Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie*. Diplomarbeit.

- Du, S.J., Purcell, S.M., Christian, J.L., McGrew, L.L. and Moon, R.T. (1995) Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol*, **15**, 2625-2634.
- Duval, A., Rolland, S., Tubacher, E., Bui, H., Thomas, G. and Hamelin, R. (2000) The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res*, **60**, 3872-3879.
- Eleftheriou, A., Yoshida, M. and Henderson, B.R. (2001) Nuclear export of human beta-catenin can occur independent of CRM1 and the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Biol Chem*, **276**, 25883-25888.
- Enders, J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., Francis, T., Jr., Hilleman, M.R., Huebner, R.J. and Payne, A.M. (1956) Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, **124**, 119-120.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R.C. and Van Der Eb, A.J. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, **7**, 215-222.
- Fei, J.W., Angel, P., Wei, Q.X. and de Villiers, E.M. (2006) TAp63alpha indirectly regulates a cutaneous HPV promoter through complex formation with Jun family members. *Oncogene*.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7413-7417.
- Felgner, P.L. and Ringold, G.M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, **337**, 387-388.
- Feller, S.M., Ren, R., Hanafusa, H. and Baltimore, D. (1994) SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci*, **19**, 453-458.
- Ferguson, M.W. (1988) Palate development. *Development*, **103 Suppl**, 41-60.
- Flewett, T.H., Bryden, A.S. and Davies, H. (1973) Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, **2**, 1497.
- Frisch, S.M. and Mymryk, J.S. (2002) Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 441-452.
- Fujino, H. and Regan, J.W. (2001) FP prostanoid receptor activation of a T-cell factor/beta -catenin signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, 12489-12492.
- Ghioni, P., Bolognese, F., Duijf, P.H., Van Bokhoven, H., Mantovani, R. and Guerrini, L. (2002) Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol Cell Biol*, **22**, 8659-8668.
- Ghioni, P., D'Alessandra, Y., Mansueto, G., Jaffray, E., Hay, R.T., La Mantia, G. and Guerrini, L. (2005) The protein stability and transcriptional activity of p63alpha are regulated by SUMO-1 conjugation. *Cell Cycle*, **4**, 183-190.
- Giese, K., Amsterdam, A. and Grosschedl, R. (1991) DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev*, **5**, 2567-2578.
- Giles, R.H., van Es, J.H. and Clevers, H. (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1653**, 1-24.
- Gomez-Lazaro, M., Fernandez-Gomez, F.J. and Jordan, J. (2004) p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem*, **60**, 287-307.
- Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W.N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J.A., Beighton, P., Black, G.C., Boles, R.G., Boon, L.M., Borrone, C., Brunner, H.G., Carle,

- G.F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M.L., Hall, B., Hennekam, R.C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C.A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R.S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M.J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B.R. and Warman, M.L. (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, **107**, 513-523.
- Goodrum, F.D. and Ornelles, D.A. (1997) The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. *J Virol*, **71**, 548-561.
- Goodrum, F.D. and Ornelles, D.A. (1998) p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol*, **72**, 9479-9490.
- Goodrum, F.D. and Ornelles, D.A. (1999) Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J Virol*, **73**, 7474-7488.
- Gordon, M.D. and Nusse, R. (2006) Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors. *J Biol Chem*.
- Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H. and Bonavida, B. (2006) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*, **25**, 1125-1142.
- Gottardi, C.J. and Gumbiner, B.M. (2004) Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol*, **167**, 339-349.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W. and Giaccia, A.J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, **379**, 88-91.
- Graham, T.A., Ferkey, D.M., Mao, F., Kimelman, D. and Xu, W. (2001) Tcf4 can specifically recognize beta-catenin using alternative conformations. *Nat Struct Biol*, **8**, 1048-1052.
- Graham, T.A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D. and Xu, W. (2000) Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell*, **103**, 885-896.
- Greber, U.F. (2002) Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 608-626.
- Hagiwara, K., McMenamin, M.G., Miura, K. and Harris, C.C. (1999) Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res*, **59**, 4165-4169.
- Hall, A.R., Dix, B.R., O'Carroll, S.J. and Braithwaite, A.W. (1998) p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat Med*, **4**, 1068-1072.
- Harada, J.N. and Berk, A.J. (1999) p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol*, **73**, 5333-5344.
- Harwood, A.J. (2001) Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell*, **105**, 821-824.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, **281**, 1509-1512.
- He, X. and Axelrod, J.D. (2006) A WNTer wonderland in Snowbird. *Development*, **133**, 2597-2603.
- Helton, E.S., Zhu, J. and Chen, X. (2006) The unique NH2-terminally deleted (DeltaN) residues, the PXXP motif, and the PPXY motif are required for the transcriptional activity of the DeltaN variant of p63. *J Biol Chem*, **281**, 2533-2542.
- Henderson, B.R. (2000) Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*, **2**, 653-660.

- Hibi, K., Trink, B., Patturajan, M., Westra, W.H., Caballero, O.L., Hill, D.E., Ratovitski, E.A., Jen, J. and Sidransky, D. (2000) AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5462-5467.
- Hierholzer, J.C. (1973) Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination. *J Infect Dis*, **128**, 541-550.
- Hierholzer, J.C., Wigand, R., Anderson, L.J., Adrian, T. and Gold, J.W. (1988) Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J Infect Dis*, **158**, 804-813.
- Hilleman, M.R. and Werner, J.H. (1954) Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*, **85**, 183-188.
- Hobom, U. and Dobbelstein, M. (2004) E1B-55-kilodalton protein is not required to block p53-induced transcription during adenovirus infection. *J Virol*, **78**, 7685-7697.
- Horikoshi, N., Usheva, A., Chen, J., Levine, A.J., Weinmann, R. and Shenk, T. (1995) Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **15**, 227-234.
- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F. and Waterman, M.L. (2001) Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet*, **28**, 53-57.
- Hu, H., Xia, S.H., Li, A.D., Xu, X., Cai, Y., Han, Y.L., Wei, F., Chen, B.S., Huang, X.P., Han, Y.S., Zhang, J.W., Zhang, X., Wu, M. and Wang, M.R. (2002) Elevated expression of p63 protein in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, **102**, 580-583.
- Huber, A.H., Nelson, W.J. and Weis, W.I. (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*, **90**, 871-882.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G. and Kemler, R. (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*, **59**, 3-10.
- Huelsken, J. and Behrens, J. (2002) The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, **115**, 3977-3978.
- Huelsken, J. and Birchmeier, W. (2001) New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 547-553.
- Huelsken, J., Birchmeier, W. and Behrens, J. (1994) E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol*, **127**, 2061-2069.
- Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. and Birchmeier, W. (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, **105**, 533-545.
- Ihara, M., Yamamoto, H. and Kikuchi, A. (2005) SUMO-1 modification of PIASy, an E3 ligase, is necessary for PIASy-dependent activation of Tcf-4. *Mol Cell Biol*, **25**, 3506-3518.
- Ikawa, S., Nakagawara, A. and Ikawa, Y. (1999) p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ*, **6**, 1154-1161.
- Ingham, P.W. and McMahon, A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, **15**, 3059-3087.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H. and Kaelin, W.G., Jr. (2000) Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*, **407**, 645-648.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T. and Weinberg, R.A. (1994) Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*, **4**, 1-7.

- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P. and Fuchs, E. (2003) Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*, **422**, 317-322.
- Jawetz, E. (1959) The story of shipyard eye. *Br Med J*, **15**, 873-876.
- Jho, E.H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N. and Costantini, F. (2002) Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **22**, 1172-1183.
- Jones, N. and Shenk, T. (1979) Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell*, **17**, 683-689.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. and Caput, D. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, **90**, 809-819.
- Kalderon, D. (2002) Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol*, **12**, 523-531.
- Kamachi, Y. and Kondoh, H. (1993) Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the delta 1-crystallin enhancer. *Mol Cell Biol*, **13**, 5206-5215.
- Kartasheva, N.N., Contente, A., Lenz-Stoppler, C., Roth, J. and Dobbelstein, M. (2002) p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene*, **21**, 4715-4727.
- Kato, S., Shimada, A., Osada, M., Ikawa, S., Obinata, M., Nakagawara, A., Kanamaru, R. and Ishioka, C. (1999) Effects of p51/p63 missense mutations on transcriptional activities of p53 downstream gene promoters. *Cancer Res*, **59**, 5908-5911.
- Kim, C.A. and Bowie, J.U. (2003) SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem Sci*, **28**, 625-628.
- Kim, P.J., Plescia, J., Clevers, H., Fearon, E.R. and Altieri, D.C. (2003) Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet*, **362**, 205-209.
- Kirn, D. (2001) Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert Opin Biol Ther*, **1**, 525-538.
- Klein, P.S. and Melton, D.A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8455-8459.
- Knapp, S., Zamai, M., Volpi, D., Nardese, V., Avanzi, N., Breton, J., Plyte, S., Flocco, M., Marconi, M., Isacchi, A. and Caiola, V.R. (2001) Thermodynamics of the high-affinity interaction of TCF4 with beta-catenin. *J Mol Biol*, **306**, 1179-1189.
- Koch, P., Gatfield, J., Lober, C., Hobom, U., Lenz-Stoppler, C., Roth, J. and Dobbelstein, M. (2001) Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer Res*, **61**, 5941-5947.
- Koga, F., Kawakami, S., Fujii, Y., Saito, K., Ohtsuka, Y., Iwai, A., Ando, N., Takizawa, T., Kageyama, Y. and Kihara, K. (2003a) Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res*, **9**, 5501-5507.
- Koga, F., Kawakami, S., Kumagai, J., Takizawa, T., Ando, N., Arai, G., Kageyama, Y. and Kihara, K. (2003b) Impaired Delta Np63 expression associates with reduced beta-catenin and aggressive phenotypes of urothelial neoplasms. *Br J Cancer*, **88**, 740-747.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Clevers, H. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*, **275**, 1784-1787.

- Koster, M.I., Kim, S., Mills, A.A., DeMayo, F.J. and Roop, D.R. (2004) p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*, **18**, 126-131.
- Koster, M.I. and Roop, D.R. (2004) The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci*, **34**, 3-9.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Zullig, S. and Basler, K. (2002) Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*, **109**, 47-60.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P. (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, **31**, 472-483.
- Krieghoff, E., Behrens, J. and Mayr, B. (2006) Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci*, **119**, 1453-1463.
- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H.A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M.Q. and Holstein, T.W. (2005) Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*, **433**, 156-160.
- Lammi, L., Arte, S., Somer, M., Jarvinen, H., Lahermo, P., Thesleff, I., Pirinen, S. and Nieminen, P. (2004) Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet*, **74**, 1043-1050.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.
- Laurikkala, J., Mikkola, M.L., James, M., Tummers, M., Mills, A.A. and Thesleff, I. (2006) p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development*, **133**, 1553-1563.
- Lee, H. and Kimelman, D. (2002) A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev Cell*, **2**, 607-616.
- Lee, L.A., Walsh, P., Prater, C.A., Su, L.J., Marchbank, A., Egbert, T.B., Dellavalle, R.P., Targoff, I.N., Kaufman, K.M., Chorzelski, T.P. and Jablonska, S. (1999) Characterization of an autoantigen associated with chronic ulcerative stomatitis: the CUSP autoantigen is a member of the p53 family. *J Invest Dermatol*, **113**, 146-151.
- Levina, E., Oren, M. and Ben-Ze'ev, A. (2004) Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene*, **23**, 4444-4453.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B. and Levine, A.J. (1994) Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev*, **8**, 1235-1246.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52.
- Liu, G., Nozell, S., Xiao, H. and Chen, X. (2004) DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol*, **24**, 487-501.
- Liu, J., Stevens, J., Rote, C.A., Yost, H.J., Hu, Y., Neufeld, K.L., White, R.L. and Matsunami, N. (2001) Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell*, **7**, 927-936.
- Logan, C.Y. and Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 781-810.

- Logan, J., Pilder, S. and Shenk, T. (1984) Functional analysis of adenovirus type 5 early region 1B. *Cancer Cells*, Vol. 2, pp. 527-532.
- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A. and Dobbelstein, M. (2003) p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem*, **278**, 32507-32516.
- Lomax, M.E., Barnes, D.M., Hupp, T.R., Picksley, S.M. and Camplejohn, R.S. (1998) Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members. *Oncogene*, **17**, 643-649.
- Lowe, S.W. and Lin, A.W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 485-495.
- Lu, H. and Levine, A.J. (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5154-5158.
- Macias, M.J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M. and Oschkinat, H. (1996) Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*, **382**, 646-649.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor.
- Mantovani, F., Gostissa, M., Collavin, L. and Del Sal, G. (2004a) KeePin' the p53 family in good shape. *Cell Cycle*, **3**, 905-911.
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., Blandino, G. and Del Sal, G. (2004b) Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell*, **14**, 625-636.
- Marchenko, G.N., Marchenko, N.D., Leng, J. and Strongin, A.Y. (2002) Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J*, **363**, 253-262.
- Massion, P.P., Taflan, P.M., Jamshedur Rahman, S.M., Yildiz, P., Shyr, Y., Edgerton, M.E., Westfall, M.D., Roberts, J.R., Pieterpol, J.A., Carbone, D.P. and Gonzalez, A.L. (2003) Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res*, **63**, 7113-7121.
- McCrea, P.D. and Gumbiner, B.M. (1991) Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J Biol Chem*, **266**, 4514-4520.
- McCrea, P.D., Turck, C.W. and Gumbiner, B. (1991) A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*, **254**, 1359-1361.
- McGrath, J.A., Duijf, P.H., Doetsch, V., Irvine, A.D., de Waal, R., Vanmolkot, K.R., Wessagowit, V., Kelly, A., Atherton, D.J., Griffiths, W.A., Orlow, S.J., van Haeringen, A., Ausems, M.G., Yang, A., McKeon, F., Bamshad, M.A., Brunner, H.G., Hamel, B.C. and van Bokhoven, H. (2001) Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet*, **10**, 221-229.
- Meek, D.W. (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, **18**, 7666-7675.
- Meigs, T.E., Fields, T.A., McKee, D.D. and Casey, P.J. (2001) Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 519-524.
- Mills, A.A. (2006) p63: oncogene or tumor suppressor? *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 38-44.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. and Bradley, A. (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, **398**, 708-713.

- Miyazaki, K., Ozaki, T., Kato, C., Hanamoto, T., Fujita, T., Irino, S., Watanabe, K., Nakagawa, T. and Nakagawara, A. (2003) A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 106-113.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. and Clevers, H. (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, **86**, 391-399.
- Moll, U.M. (2003) The Role of p63 and p73 in tumor formation and progression: coming of age toward clinical usefulness. Commentary re: F. Koga et al., Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin. Cancer Res.*, 9: 5501-5507, 2003, and P. Puig et al., p73 Expression in human normal and tumor tissues: loss of p73alpha expression is associated with tumor progression in bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9: 5642-5651, 2003. *Clin Cancer Res*, **9**, 5437-5441.
- Moon, R.T., Campbell, R.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., Shih, J. and Fraser, S. (1993) Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development*, **119**, 97-111.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, **275**, 1787-1790.
- Morita, M., Uramoto, H., Nakata, S., Ono, K., Sugaya, M., Yoshimatsu, T., Oyama, T., Hanagiri, T., Sugio, K. and Yasumoto, K. (2005) Expression of deltaNp63 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Anticancer Res*, **25**, 3533-3539.
- Muller, H., Samanta, R. and Wieschaus, E. (1999) Wingless signaling in the *Drosophila* embryo: zygotic requirements and the role of the frizzled genes. *Development*, **126**, 577-586.
- Nateri, A.S., Spencer-Dene, B. and Behrens, A. (2005) Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*, **437**, 281-285.
- Neufeld, K.L., Nix, D.A., Bogerd, H., Kang, Y., Beckerle, M.C., Cullen, B.R. and White, R.L. (2000a) Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12085-12090.
- Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R. and White, R.L. (2000b) APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep*, **1**, 519-523.
- Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J.L. and Muller, U. (2004) Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet*, **74**, 558-563.
- Norrbby, E., Bartha, A., Boulanger, P., Dreizin, R.S., Ginsberg, H.S., Kalter, S.S., Kawamura, H., Rowe, W.P., Russell, W.C., Schlesinger, W. and Wigand, R. (1976) Adenoviridae. *Intervirology*, **7**, 117-125.
- Nozell, S., Wu, Y., McNaughton, K., Liu, G., Willis, A., Paik, J.C. and Chen, X. (2003) Characterization of p73 functional domains necessary for transactivation and growth suppression. *Oncogene*, **22**, 4333-4347.
- O'Shea, C.C., Johnson, L., Bagus, B., Choi, S., Nicholas, C., Shen, A., Boyle, L., Pandey, K., Soria, C., Kunich, J., Shen, Y., Habets, G., Ginzinger, D. and McCormick, F. (2004) Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell*, **6**, 611-623.
- Omer, C.A., Miller, P.J., Diehl, R.E. and Kral, A.M. (1999) Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 584-590.



- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M. and Ikawa, S. (1998) Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*, **4**, 839-843.
- Ozaki, T., Naka, M., Takada, N., Tada, M., Sakiyama, S. and Nakagawara, A. (1999) Deletion of the COOH-terminal region of p73 $\alpha$  enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res*, **59**, 5902-5907.
- Park, B.J., Lee, S.J., Kim, J.I., Lee, S.J., Lee, C.H., Chang, S.G., Park, J.H. and Chi, S.G. (2000) Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res*, **60**, 3370-3374.
- Patturajan, M., Nomoto, S., Sommer, M., Fomenkov, A., Hibi, K., Zangen, R., Poliak, N., Califano, J., Trink, B., Ratovitski, E. and Sidransky, D. (2002) DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. *Cancer Cell*, **1**, 369-379.
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F. and De Luca, M. (2001) p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3156-3161.
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J. and Shenk, T. (1986) The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol*, **6**, 470-476.
- Ponting, C.P. (1995) SAM: a novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. *Protein Sci*, **4**, 1928-1930.
- Prieve, M.G., Guttridge, K.L., Munguia, J. and Waterman, M.L. (1998) Differential importin- $\alpha$  recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1. *Mol Cell Biol*, **18**, 4819-4832.
- Prieve, M.G. and Waterman, M.L. (1999) Nuclear localization and formation of beta-catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression. *Mol Cell Biol*, **19**, 4503-4515.
- Prives, C. and Hall, P.A. (1999) The p53 pathway. *J Pathol*, **187**, 112-126.
- Reich, N.C., Sarnow, P., Duprey, E. and Levine, A.J. (1983) Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology*, **128**, 480-484.
- Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Fulford, L.G., Martins, A. and Schmitt, F.C. (2003) P63-driven nuclear accumulation of beta-catenin is not a frequent event in human neoplasms. *Pathol Res Pract*, **199**, 785-793.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R. (1987) The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, **50**, 649-657.
- Roose, J. and Clevers, H. (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1424**, M23-37.
- Rosen, L. (1960) A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *Am J Hyg*, **71**, 120-128.
- Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D.R., Liu, Y.C., Vousden, K.H., Cesareni, G. and Melino, G. (2005) The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *Embo J*, **24**, 836-848.
- Rother, K., Johne, C., Spiesbach, K., Haugwitz, U., Tschop, K., Wasner, M., Klein-Hitpass, L., Moroy, T., Mossner, J. and Engeland, K. (2004) Identification of Tcf-4 as a transcriptional target of p53 signalling. *Oncogene*, **23**, 3376-3384.

- Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N.J., Scheffner, M. and zur Hausen, H. (1998) Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol*, **72**, 9470-9478.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H. and Ward, T.G. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, **84**, 570-573.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Munemitsu, S. and Polakis, P. (1995) The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem*, **270**, 5549-5555.
- Rudiger, R.A., Haase, W. and Passarge, E. (1970) Association of ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip-palate. *Am J Dis Child*, **120**, 160-163.
- Sadot, E., Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Shnizer, D., Lando, Z., Zharhary, D., Kam, Z., Ben-Ze'ev, A. and Geiger, B. (2002) Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci*, **115**, 2771-2780.
- Sadot, E., Geiger, B., Oren, M. and Ben-Ze'ev, A. (2001) Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol*, **21**, 6768-6781.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M. and Kondoh, H. (1997) A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*, **124**, 1313-1322.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M. and Kondoh, H. (1999) Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, **126**, 3915-3924.
- Schultz, J., Ponting, C.P., Hofmann, K. and Bork, P. (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci*, **6**, 249-253.
- Senoo, M., Seki, N., Ohira, M., Sugano, S., Watanabe, M., Inuzuka, S., Okamoto, T., Tachibana, M., Tanaka, T., Shinkai, Y. and Kato, H. (1998) A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 603-607.
- Serber, Z., Lai, H.C., Yang, A., Ou, H.D., Sigal, M.S., Kelly, A.E., Darimont, B.D., Duijf, P.H., Van Bokhoven, H., McKeon, F. and Dotsch, V. (2002) A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol Cell Biol*, **22**, 8601-8611.
- Shenk, T. (2001) "Adenoviridae and their replication." In: Fields, B., Howley, P., Knipe, D. (eds). In *Virology*. Lippincott-Raven, New York, NY, pp. 2265-2300.
- Sherr, C.J. and Weber, J.D. (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 94-99.
- Shimada, A., Kato, S., Enjo, K., Osada, M., Ikawa, Y., Kohno, K., Obinata, M., Kanamaru, R., Ikawa, S. and Ishioka, C. (1999) The transcriptional activities of p53 and its homologue p51/p63: similarities and differences. *Cancer Res*, **59**, 2781-2786.
- Shimokawa, T., Furukawa, Y., Sakai, M., Li, M., Miwa, N., Lin, Y.M. and Nakamura, Y. (2003) Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res*, **63**, 6116-6120.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5522-5527.
- Simcha, I., Shtutman, M., Salomon, D., Zhurinsky, J., Sadot, E., Geiger, B. and Ben-Ze'ev, A. (1998) Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol*, **141**, 1433-1448.
- Spiegelman, V.S., Slaga, T.J., Pagano, M., Minamoto, T., Ronai, Z. and Fuchs, S.Y. (2000) Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell*, **5**, 877-882.

- Stadeli, R. and Basler, K. (2005) Dissecting nuclear Wingless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mech Dev*, **122**, 1171-1182.
- Stambolic, V., Ruel, L. and Woodgett, J.R. (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*, **6**, 1664-1668.
- Stapleton, D., Balan, I., Pawson, T. and Sicheri, F. (1999) The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat Struct Biol*, **6**, 44-49.
- Stewart, C.L., Schuetze, S., Vanek, M. and Wagner, E.F. (1987) Expression of retroviral vectors in transgenic mice obtained by embryo infection. *Embo J*, **6**, 383-388.
- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccarini, A., Del Sal, G., Levvero, M., Sacchi, A., Oren, M. and Blandino, G. (2002) Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p53 activities. *J Biol Chem*, **277**, 18817-18826.
- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G. and Blandino, G. (2001) Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J Biol Chem*, **276**, 15164-15173.
- Takahashi, Y., Noguchi, T., Takeno, S., Kimura, Y., Okubo, M. and Kawahara, K. (2006) Reduced expression of p63 has prognostic implications for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, **15**, 323-328.
- Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, **398**, 422-426.
- Thanos, C.D. and Bowie, J.U. (1999) p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci*, **8**, 1708-1710.
- Thanos, C.D., Goodwill, K.E. and Bowie, J.U. (1999) Oligomeric structure of the human EphB2 receptor SAM domain. *Science*, **283**, 833-836.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R. (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, **267**, 100-104.
- Tolwinski, N.S. and Wieschaus, E. (2001) Armadillo nuclear import is regulated by cytoplasmic anchor Axin and nuclear anchor dTCF/Pan. *Development*, **128**, 2107-2117.
- Tonon, G., Wong, K.K., Maulik, G., Brennan, C., Feng, B., Zhang, Y., Khatry, D.B., Protopopov, A., You, M.J., Aguirre, A.J., Martin, E.S., Yang, Z., Ji, H., Chin, L. and Depinho, R.A. (2005) High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9625-9630.
- Townsley, F.M., Cliffe, A. and Bienz, M. (2004) Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol*, **6**, 626-633.
- Trentin, J.J., Yabe, Y. and Taylor, G. (1962) The quest for human cancer viruses. *Science*, **137**, 835-841.
- Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J. and Sidransky, D. (1998) A new human p53 homologue. *Nat Med*, **4**, 747-748.
- Turnell, A.S., Grand, R.J. and Gallimore, P.H. (1999) The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J Virol*, **73**, 2074-2083.
- Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Takada, R., Takada, S., Chiba, T. and Shimotohno, K. (2001) p73beta, a variant of p73, enhances Wnt/beta-catenin signaling in Saos-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 327-333.

- Urist, M.J., Di Como, C.J., Lu, M.L., Charytonowicz, E., Verbel, D., Crum, C.P., Ince, T.A., McKeon, F.D. and Cordon-Cardo, C. (2002) Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol*, **161**, 1199-1206.
- Valenta, T., Lukas, J. and Korinek, V. (2003) HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2369-2380.
- van Beest, M., Dooijes, D., van De Wetering, M., Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O. and Clevers, H. (2000) Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *J Biol Chem*, **275**, 27266-27273.
- van Bokhoven, H., Hamel, B.C., Bamshad, M., Sangiorgi, E., Gurrieri, F., Duijf, P.H., Vanmolkot, K.R., van Beusekom, E., van Beersum, S.E., Celli, J., Merks, G.F., Tenconi, R., Fryns, J.P., Verloes, A., Newbury-Ecob, R.A., Raas-Rotschild, A., Majewski, F., Beemer, F.A., Janecke, A., Chitayat, D., Crisponi, G., Kayserili, H., Yates, J.R., Neri, G. and Brunner, H.G. (2001) p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*, **69**, 481-492.
- van Bokhoven, H. and McKeon, F. (2002) Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *Trends Mol Med*, **8**, 133-139.
- Van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V. and Clevers, H. (1996) Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol Cell Biol*, **16**, 745-752.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M. and Clevers, H. (1997) Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell*, **88**, 789-799.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D. and Clevers, H. (1991) Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *Embo J*, **10**, 123-132.
- van Genderen, C., Okamura, R.M., Farinas, I., Quo, R.G., Parslow, T.G., Bruhn, L. and Grosschedl, R. (1994) Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev*, **8**, 2691-2703.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D. and Moon, R.T. (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*, **5**, 367-377.
- von Kries, J.P., Winbeck, G., Asbrand, C., Schwarz-Romond, T., Sochnikova, N., Dell'Oro, A., Behrens, J. and Birchmeier, W. (2000) Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol*, **7**, 800-807.
- Wagner, E.F., Vanek, M. and Vennstrom, B. (1985) Transfer of genes into embryonal carcinoma cells by retrovirus infection: efficient expression from an internal promoter. *Embo J*, **4**, 663-666.
- Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15335-15340.
- Waterman, M.L., Fischer, W.H. and Jones, K.A. (1991) A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes Dev*, **5**, 656-669.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A. and DiNardo, S. (2000) arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, **407**, 527-530.

- White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W.S., Kusher, D.I. and Gooding, L.R. (1992) The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol*, **12**, 2570-2580.
- Wiechens, N. and Fagotto, F. (2001) CRM1- and Ran-independent nuclear export of beta-catenin. *Curr Biol*, **11**, 18-27.
- Wiechens, N., Heinle, K., Englmeier, L., Schohl, A. and Fagotto, F. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of Axin, a negative regulator of the Wnt-beta-catenin Pathway. *J Biol Chem*, **279**, 5263-5267.
- Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H. and Pals, S.T. (1999) Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol*, **154**, 515-523.
- Winston, J.T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C.Y., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1999) The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev*, **13**, 270-283.
- Wissmuller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M. and Wegner, M. (2006) The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1735-1744.
- Wu, G., Osada, M., Guo, Z., Fomenkov, A., Begum, S., Zhao, M., Upadhyay, S., Xing, M., Wu, F., Moon, C., Westra, W.H., Koch, W.M., Mantovani, R., Califano, J.A., Ratovitski, E., Sidransky, D. and Trink, B. (2005) DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res*, **65**, 758-766.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**, 1126-1132.
- Xing, Y., Clements, W.K., Kimelman, D. and Xu, W. (2003) Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev*, **17**, 2753-2764.
- Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y. and Kikuchi, A. (2003) Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *Embo J*, **22**, 2047-2059.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. and McKeon, F. (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, **2**, 305-316.
- Yang, A. and McKeon, F. (2000) P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 199-207.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. and McKeon, F. (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, **398**, 714-718.
- Yang, L., Yamasaki, K., Shirakata, Y., Dai, X., Tokumaru, S., Yahata, Y., Tohyama, M., Hanakawa, Y., Sayama, K. and Hashimoto, K. (2006) Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes. *J Dermatol Sci*, **42**, 111-119.
- Ying, H., Chang, D.L., Zheng, H., McKeon, F. and Xiao, Z.X. (2005) DNA-binding and transactivation activities are essential for TAp63 protein degradation. *Mol Cell Biol*, **25**, 6154-6164.
- Yokoya, F., Imamoto, N., Tachibana, T. and Yoneda, Y. (1999) beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Mol Biol Cell*, **10**, 1119-1131.
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C. and Moll, U.M. (2001) Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem*, **276**, 11310-11316.

Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Gao, Z., Ehrlich, S.M., Fields, J.Z. and Boman, B.M. (2001a) Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res*, **61**, 8664-8667.

Zhang, X., Gaspard, J.P. and Chung, D.C. (2001b) Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*, **61**, 6050-6054.

Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., Zhu, K. and Chen, X. (1999) Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene*, **18**, 2149-2155.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Constanze Möritz
Anschrift	Weidenweg 14, 37124 Rosdorf
Geburtsdatum	29. September 1975
Geburtsort	Leipzig
Familienstand	verheiratet

## Schulausbildung

1982 – 1990	Allgemeinbildende POS Comenius, Delitzsch
1990 – 1994	Ehrenberg-Gymnasium, Delitzsch
24.06.1994	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium und wissenschaftliche Ausbildung

WS 1994/95 – SS 1995	Studium der Rechtswissenschaften, Universität Leipzig
WS 1995/96 – SS 1997	Grundstudium der Biologie, Universität Leipzig
08.10.1997	Abschluss: Vordiplom
WS 1997/98 – SS 2000	Hauptstudium der Biologie, Philipps-Universität Marburg Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik und Virologie Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Funktion der Phosphorylierung des VP30 des Marburg-Virus“
28.08.2000	Abschluss: Diplom
04.09.2000 – 13.10.2000	Praktikum in der Abteilung Antiinfektiva, Bayer AG, Pharmaforschungszentrum Wuppertal
11/2000 – 07/2006	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg
11/2000 – 10/2002	Stipendiatin der FAZIT-Stiftung

## Publikationen

Modrof, J., Möritz, C., Kolesnikova, L., Konakova, T., Hartlieb, B., Randolph, A., Mühlberger, E. and Becker, S. (2001) Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology*, **287**, 171-182.

Löhr, K., Möritz, C., Contente, A. and Dobbelstein, M. (2003) p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem*, **278**, 32507-32516.

Möritz, C. and Dobbelstein, M. (2006) E1A genes of adenovirus type 2 and type 5 are expressed at different levels. *Arch Virol*, **151**, 1085-1092.

Feuerborn, A., Möritz, C., Von Bonin, F., Dobbelstein, M., Trümper, L., Stürzenhofecker, B. and Kube, D. (2006) Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*, **47**, 1932-1940.

Marburg/Lahn, 21. Juli 2006

.....  
Constanze Möritz

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Virologie in Marburg anzufertigen. Durch das Engagement für seine Mitarbeiter hat er als Institutsleiter ein ausgesprochen kollegiales Arbeitsumfeld geprägt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Dobbeltstein, der mir dieses interessante Projekt der vorliegenden Dissertation zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat. Ich danke ihm für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung. In ausgiebigen Projektgesprächen, Telefonaten oder E-Mail-Korrespondenzen hat er jederzeit eine rege Diskussion gefördert und war für Anregungen und Fragen offen.

Den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dobbeltstein in Marburg, sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Göttingen und Odense danke ich herzlich für ihre fachliche Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft, ein phantastisches Arbeitsklima und viele gesellige Stunden nach getaner Arbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt Michael Schümann und Isabella Drewelus, die nach dem Umzug der Arbeitsgruppe nach Odense mit mir zusammen das Marburger Labor noch ein Jahr aufrecht erhalten haben.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie möchte ich mich für die stets erwiesene Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Becker danke ich für ihre technische Unterstützung und viele anregende Gespräche. Frau PD Dr. Elke Mühlberger danke ich für ihr offenes Ohr und ihren persönlichen Rat.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, meinem Mann Lars Göpfert und meinen Eltern Gabriele und Reiner Möritz, die mich fortwährend unterstützt und gefördert haben.



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

### **Das Tumorsuppressor-Homologe p63 als Modulator des Wnt-Signalweges**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, 21. Juli 2006

.....

Constanze Möritz

